

**STRESSZVÁLASZ HALAKBAN: METALLOTHIONEIN  
ÉS *hsp90* GÉNEK AZONOSÍTÁSA ÉS EXPRESSZIÓJUK  
VIZSGÁLATA PONTYBAN (*Cyprinus carpio*)**

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Hermesz Edit**

**Témavezető: Dr. Ábrahám Magdolna**  
tanszékvezető egyetemi docens

**Szegedi Tudományegyetem**  
**Természettudományi Kar**  
**Biokémiai Tanszék**

**2002**





## TARTALOMJEGYZÉK

<b>BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS.....</b>	<b>4</b>
<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>6</b>
<b>I. A metallothioneinek.....</b>	<b>6</b>
A metallothioneinek általános jellemzése.....	6
A metallothionein I csoport szerkezeti jellemzése.....	7
A metallothionein gének szerkezete és szabályozása.....	8
A metallothioneinek funkciói.....	11
<i>Az MT-ek szerepe az esszenciális fémek tárolásában,</i> <i>elosztásában és szállításában.....</i>	11
<i>Az MT-ek detoxifikáló szerepe nehézfém expozíció esetén.....</i>	13
<i>Kadmium detoxifikáció.....</i>	13
<i>Arzén detoxifikáció.....</i>	15
<b>II. Stresszfehérjék.....</b>	<b>16</b>
A 90 kDa molekuláris <i>chaperone</i> fehérjecsalád.....	18
A <i>hsp90</i> gének szerkezete és expressziójuk.....	19
A <i>hsp90</i> gén expressziójának szabályozása.....	21
Hsp90 fehérjék szerkezete.....	23
A Hsp90 fehérjék lehetséges funkciói a sejtben.....	24
<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>28</b>
<i>Kísérleti állatok és kezelési körülmények.....</i>	28
<i>Fémkezelések.....</i>	28
<i>Hő és hidegsokk.....</i>	29
<i>RNS preparálás fagyasztott mintákból.....</i>	29
<i>Az RNS frakcionálása és blottolása.....</i>	30
<i>Reverz transzkripció (RT).....</i>	31
<i>PCR amplifikáció.....</i>	31
<i>Primerek.....</i>	32
<i>Genomiális DNS preparálás.....</i>	33
<i>Gélelektóforézis, fragment izolálás.....</i>	33
<i>Ligálás, transzformálás, plazmid DNS preparálás.....</i>	34
<i>Kadmium és cink tartalom meghatározása ponty szövetmintákban.....</i>	35
<i>Géldokumentáció, denzitometráls.....</i>	35

<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>36</b>
A metallothionein és <i>hsp90</i> gének azonosításának stratégiája.....	36
1. Metallothionein gének izolálása és expressziójának vizsgálata.....	37
<i>Metallothionein specifikus cDNS-ek amplifikálása pontyból.....</i>	<i>37</i>
<i>Ponty metallothionein gének amplifikálása genomiális DNS templátról... </i>	<i>41</i>
<i>Az MT gének promóter régióinak összehasonlítása és elemzése.....</i>	<i>43</i>
<i>Az MT gének szövetspecifikus alap expressziója.....</i>	<i>44</i>
<i>Kadmium hatása a MT gének expressziójára májban, vesében és agyban</i>	<i>46</i>
<i>Kadmium és cink akkumulációja májban, vesében és agyban.....</i>	<i>48</i>
<i>Réz hatása az MT gének expressziójára májban, vesében és agyban.....</i>	<i>48</i>
<i>Metallothionein gének expressziója arzénal kezelt pontyban.....</i>	<i>51</i>
<i>Hőmérsékletváltozás hatása az MT gének expressziójára.....</i>	<i>51</i>
2. A <i>hsp90</i> gének izolálása és expressziójának vizsgálat.....	54
<i>Ponty hsp90 specifikus cDNS-ek amplifikálása RT-PCR-ral.....</i>	<i>54</i>
<i>A hsp90<math>\alpha</math> és hsp90<math>\beta</math> cDNS-ek azonosítása.....</i>	<i>56</i>
<i>A hsp90 gének alap expressziójának vizsgálata ponty szövetmintákban... </i>	<i>58</i>
<i>Hőmérsékletváltozás indukálta hsp90 gén expresszió.....</i>	<i>59</i>
<i>Fémkezelések hatása a hsp90 gének expressziójára.....</i>	<i>62</i>
<b>AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBESZÉLÉSE.....</b>	<b>64</b>
Metallothioneinek.....	64
<i>hsp90</i> gének.....	71
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>74</b>
<b>PUBLIKÁCIÓJEGYZÉK.....</b>	<b>75</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>78</b>
<b>MAGYARNYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ</b>	
<b>ANGOLNYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ</b>	



## BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

A nehézfémek illetve vegyületeik egyre nagyobb mértékben terhelik környezetünket, s tekintettel arra, hogy nem „biodegradábilisak”, toxikus hatásuk komoly veszélyt jelent az élőlények számára. A vízi környezet toxikus nehézfém terhelésének egy kis része (pl. Cd, As) geológiai adottságok függvénye, potenciális veszélyforrást azonban az ipari és mezőgazdasági tevékenység jelent, mint ahogyan azt nemrég a Tiszán és annak mellékfolyóin lezajlott környezeti katasztrófa is jelezte. A vízi környezetben a halak, különösen táplálkozási lánc csúcsán levők, melyek különböző algákkal, rákokkal, puhatestűekkel táplálkoznak, fokozott nehézfém terhelésnek lehetnek kitéve, mivel egyrészt a táplálékkal együtt felhalmozzák testükben az idegen mérgező anyagokat, másrészt, kopolyájukkal, bőrükkel állandó, szoros kapcsolatban vannak a vízzel, ezáltal a vízben oldott anyagokkal. A nehézfémek a keringésbe jutva plazmaproteinekhez, hemoglobinhoz kapcsolódva szállítódnak és általában a sejtmembránok ioncsatornáin, kompetíció révén jutnak a citoplazmába. A halak szervezetében elsősorban a májban és a vesében, továbbá a kopolyában, és kisebb mértékben más szövetekben, fehérjékhez kötötten halmozódnak fel.

A fizikai és kémiai jellegű környezeti hatások egy sor olyan fehérje szintézisét indukálják az élőlényekben, melyek védő, szabályozó funkciót látnak el a sejtben. A környezet stresszhatásaira adott válaszadás képessége általános tulajdonsága az élő szervezeteknek és maguk az indukálódott gének is nagyfokú homológiát mutatnak a különböző fajok között az egyes géncsaládokon belül.

A stresszválaszban szerepet játszó gének molekuláris szintű azonosítását és az expressziójukban potenciális induktorok, környezeti szennyező anyagok hatására bekövetkező változások tanulmányozását tűztük ki célul pontyban (*Cyprinus carpio*). A dolgozatban két, a stressz-válaszadásban bizonyítottan résztvevő géncsalád, a

metallothioneinek (MT) és a *hsp90* gének vizsgálatát foglaljuk össze. Az MT-ek a sejtekben általánosan előforduló, magas fémtartalmú fehérjék, esszenciális szerepük van a detoxifikációs folyamatokban. A Hsp90 molekulák többek között szerepet játszanak számos, a megfelelő harmadlagos szerkezetében károsodott fehérjék aggregációjának megakadályozásában. Célunk volt mind a két családból lehetőleg több izoforma azonosítása. Ennek sikere esetén terveztük az izoformákat kódoló gének expressziójának vizsgálatát kezeletlen halak, illetve különböző toxicitású nehézfém kezelésnek, és hirtelen hőmérsékletváltozásnak kitett állatok szerveiben. A fémek közül vizsgálni kívántuk a Cd, mint az egyik legtoxikusabb nehézfém, a Cu, mint esszenciális, de nagy koncentrációban toxikus fém, és az As, mint az említettek közül azonos koncentrációban a legkevésbé toxikus nehézfém hatását. Az azonosított gének expresszióját elsősorban májban és vesében, a detoxifikáció két központi szervében kívántuk követni. Terveztük továbbá a különböző kezelések hatásának vizsgálatát az agyban, illetve különböző agyrégiókban: a *cerebellum*-ban, melynek védelmében kiemelkedő védő funkciót láthat el a vér-agy gát, és az *olfactory* lebenyben, az egyetlen olyan agyterületen, ahol ez a védő funkció nem érvényesül.

A különböző gének expressziójának vizsgálata mellett terveztük a bevitt fém felhalmozódásának mérését, továbbá fizikai stressznek kitett állatok szerveiben az esszenciális fémek közül a Zn tartalom meghatározását.

# **IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

## **I. A metallothioneinek**

### **A metallothioneinek általános jellemzése**

1957-ben, a ciszteinben gazdag, Cd kötő fehérjék ló veséből történő izolálásával Margoshes és Vallee egy új kis molekulatömegű fehérjecsalád, a metallothioneinek (MT) kutatását indította el (Margoshes és Vallee 1957; Kagi 1993). Az MT-ek mai ismereteink szerint az egyetlen olyan fehérjék, melyek denaturálódás nélkül képesek a Cd ionok megkötésére, szemben a nagy molekulatömegű fehérjék csoportjával, melyek a fémionok kötése után konformáció változást szenvednek el (Suzuki 1992). Az MT-ek abban is különböznek a legtöbb fémtartalmú fehérjétől, hogy azoknál sokkal nagyobb mennyiségben tartalmaznak fémet, és a fémkötéseik kinetikailag labilisak. E tulajdonságuk teszi őket alkalmassá a fémionok szállítására és elosztására az élő szervezetekben.

Az MT-ek az élővilágban általánosan előforduló fehérjék, az elmúlt 45 év alatt már számos fajból izolálták őket, a prokariótáktól az eukarióta mikroorganizmusokon és magasabb rendű növényeken át az emberig (Kagi és Kojima 1987). Strukturális hasonlóságaik alapján három csoportba sorolhatók (Fowler és mtsi, 1987):

- I. azok a polipeptidek, melyek elsődleges szerkezete és a cisztein aminosavak elhelyezkedése közel azonos a ló veséből izolált, alaptípusnak számító MT-el.
- II. azok a polipeptidek, melyek szerkezete nem vagy csak igen távoli evolúciós kapcsolatban van a ló vese MT-el (pl. élesztők MT-ek).
- III. azok a fém-thiolát polipeptidek, melyek nem riboszómális fehérjeszintézis útján keletkeznek (növényekben, mikroorganizmusokban).



Az első két osztályba tartozó MT-ek egy fehérjeláncból álló, a gerincesekben jellemzően 60-64, a gerinctelenekben és gombákban ennél kevesebb aminosavból felépülő fehérjék (pl. a *Neurospora crassa*-ból izolált MT csak 25 aminosavból áll). A III. osztályba sorolható fehérjék gyakran oligomer struktúrák, két vagy több, változó hosszúságú polipeptidből épülnek fel (Kagi és Kojima, 1987).

A halak MT fehérjéi az első osztályba tartoznak, ezért a továbbiakban részletesen csak ennek az osztálynak a jellemzésével foglalkozunk.

### **A metallothionein I csoport szerkezeti jellemzése**

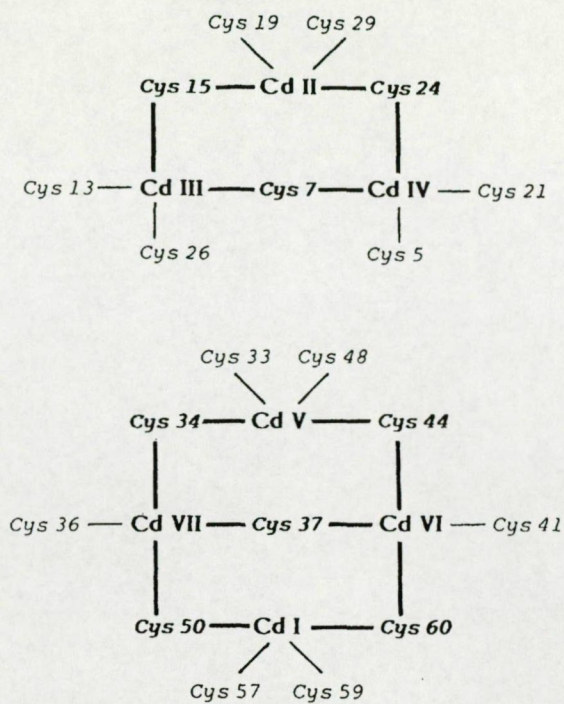
Az első csoportba tartozó emlős MT fehérjéknek 4 fő izoformáját különböztetjük meg; az állatvilágban általánosan előforduló MT-I és MT-II mellett azonosították még a központi idegrendszerre specifikus MT-III (Uchida és mtsi, 1991; Imagawa és mtsi, 1995) valamint a pikkelyes hámsejtekre jellemző MT-IV-et kódoló géneket is (Quaife és mtsi, 1994).

Az MT-ek szerkezetéről, funkciójukról meglévő ismereteink elsősorban az emlősökből származó fehérjéken végzett vizsgálatok eredményei. Kis molekulatömegű (6-7 kDa), magas fémtartalmú (~ 7 db/molekula) és jellegzetes aminosav összetételű polipeptidek. Nem, vagy csak rendkívül alacsony arányban tartalmaznak aromás aminosavakat és hisztidint, míg az aminosav tartalmuk közel egyharmada cisztein (~ 20/molekula). A polipeptidláncon belül a ciszteinek pozíciója konzervált, a Cys-x-Cys, Cys-x-x-Cys illetve Cys-Cys motívumok a fémionokkal térhálós fém-thiolát komplexekbe rendeződnek. Az MT-ekben valamennyi fém thiolát-ligand formájában kötött, 4 ciszteinil aminosav szulfhidril csoportjaihoz kapcsolódik egy-egy fématom, tetrahedrális geometriát kialakítva. A kötött formában jelenlevő 7 fématom két csoportba (*clusterbe*) különül el, 3 illetve 4 fém megoszlásban, eleget téve az MT-eket

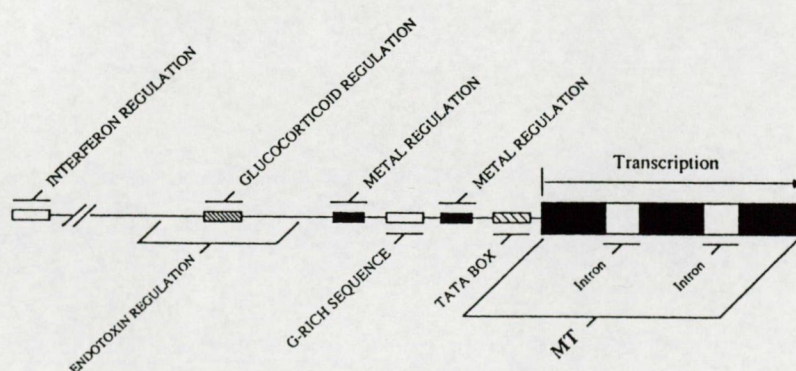
jellemző 7 fém/20 cisztein sztöhiometriának (Kagi 1974). A két fémkötő *domain* egymástól jól elkülöníthető: a fehérje N-terminális része a  $\beta$  *domain*-t foglalja magába, ahol 9 cisztein 3 fématom kötésében vesz részt, míg az  $\alpha$  *domain*-nek nevezett C terminális régióban, 11 cisztein 4 fématommal létesít kötést (1. ábra). A *domain*-ek fémmel való feltöltődésének meghatározott sorrendje van; először a 4 fém-thiolátot tartalmazó  $\alpha$  *domain* telítődik, és csak ezután kerül sor a labilisabb kötések tartalmazó  $\beta$  *domain* 3 fémmel való feltöltésére (Nielson és Winge 1983). A fémek leadása a kötődéssel ellentétes sorrendben történik meg. A fémmel telített MT rezisztensebb a proteázok hatásaival szemben, mint az apothionein, vagy a részlegesen telített, kevesebb, mint 5 fématomot kötő fehérje (Kagi 1991; Choudhuri és mtsi, 1992; McKim és mtsi, 1992). A fém-thiolát centrumok geometriája magyarázatként szolgálhat a cisztein aminosavak konzervált elhelyezkedésének fontosságára. A struktúra konzerváltsága valószínűleg a funkcionális igényeknek megfelelően alakult ki.

### **A metallothionein gének szerkezete és szabályozása**

Az MT-ek általános előfordulása ellenére a gének számát és komplexitását tekintve lényeges faji különbségeket figyelhetünk meg. Emberben például legalább 15 MT gén lokalizálható a 16-os kromoszómán, melyek tandem helyezkednek el. Az MT-II, MT-III és MT-IV gének egy-egy kópiában vannak jelen, míg az MT-I génnek eddig 12 variánsát különböztették meg (jelölésük kis betűkkel történik, pl. MT-Ia), s közülük 5-ről már bizonyított, hogy funkcionálisan aktív (West és mtsi, 1990; Quaife és mtsi, 1994). A halak MT rendszere ennél jóval kisebb komplexitást mutat, pisztrángban például - melyben halak közül elsőként azonosítottak egynél több MT gént - csak két izoformát (tMT-A és tMT-B) írtak le (Zafarullah és mtsi, 1988).



1. ábra: A Cd-Cys kötések elhelyezkedése az emberi Cd-MT-2 fehérjében. Fent:  $\beta$  domain 3 fém-thiolát centrummal. Lent:  $\alpha$  domain 4 fém-thiolát centrummal.



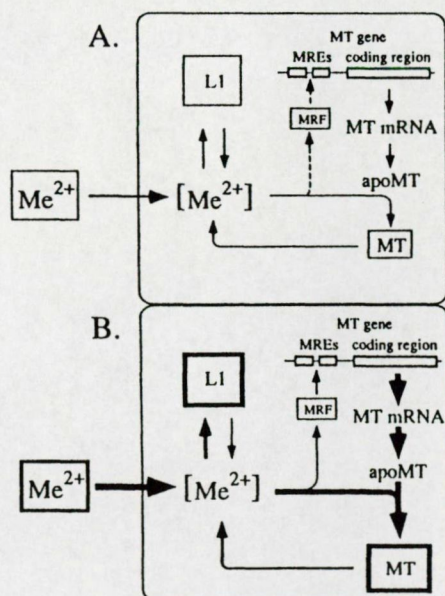
2. ábra: Emlős MT gén szerkezete (Roesijadi, 1992)



Valamennyi ismert MT gén 3 exont és két intront tartalmaz (2. ábra). Az exonok nukleotid sorrendje valamint az exon-intron határok pozíciója rendkívül konzervált. A nem kódoló szakaszok (intronok, 5' és 3' nem transzlálódó régiók) hosszát és szekvenciáját azonban, még azonos fajon belül is, lényeges diverzitás jellemzi.

Az emlős MT gének expressziója elsősorban transzkripcionális szinten szabályozódik (Palmiter 1987). Többek között különböző fémek, hormonok, antioxidáns molekulák megemelkedett szintje indukálja az MT mRNS-ek szintézisét a gének 5' régiójában található regulációs szakaszokon (*cis-acting responsive element*) keresztül (2. ábra) (Palmiter 1987; Andrews 1990; Dalton és mtsi, 1994; Kelly és mtsi, 1997). Ezek közül számos olyan szekvencia van, mely egyedi, azaz csak egy adott MT génre vagy fajra jellemző. Az MT promóter régióban általánosan előforduló szekvencia az MRE (*metal responsive element*); mely egy 13-15 nukleotidból álló, TGCA/GCNC *core* szekvenciát tartalmazó, mindig több kópiában jelenlévő szabályozó elem (Hamer 1986; Palmiter 1987). Fémindukció esetén egy specifikus fehérje, az MRF (*metal responsive factor*; Westin és Schaffner 1988), a fém kötését követő konformációs változás során aktiválódik, és ezáltal kötődni képes az MRE régiókhoz. Deléciós MT promóter régiók funkcionális elemzése alapján bizonyított, hogy néhány MRE szekvencia jelenléte nélkülözhetetlen az MT-I/MT-II gének alap szintű transzkripciójához is. Samson és Gedamu (1998) olyan transzgenikus egeret használva, ahol az MRF fehérjét kódoló gén mindkét allélját inaktiválták, kimutatták, hogy az MRF fehérje nem csak növekvő fémterhelés esetén játszik szerepet az MT gén szabályozásában, hanem esszenciális az alap expresszióhoz is (Palmiter 1994). A sejten belüli fémionok kötése és eloszlása olyan dinamikus folyamat, amit befolyásol a beáramló ionok mennyisége, ill. a rendelkezésre álló ligandok természete és előfordulási arányuk is. Alacsony fémkoncentráció esetén az MT szint alacsony és a

fémek megoszlása az MT-ek és a nem-thionein típusú fémkötő ligandok között egyensúlyban van (3. ábra). Növekvő fémterhelés hatására elsősorban az MT és MRF molekulák telítődnek, s a fémionok fokozott mértékben kötődnek a nem-thionein típusú ligandokhoz is. Az aktiválódott szabályozó fehérjék kötődnek az MT gén regulációs szakaszaihoz (MRE), mely a gén fokozott átírását eredményezi. Az indukciót követően nő a sejtekben az MT szint, fokozódik az intracelluláris fémionok megkötése, illetve megtörténik a fémionok átvétele a nem-thionein ligandokról. MT-kötött formában megszűnik a fémionok toxikus hatása, mely az expozíciót követően két időpontban jöhet létre: a fém felvétel kezdetén az MT gén indukcióját megelőzően, illetve a terhelés előrehaladtával, amikor a fémionok olyan mértékben felhalmozódnak, hogy kimerítik az újonnan szintetizálódott MT-ek fémkötő kapacitását.



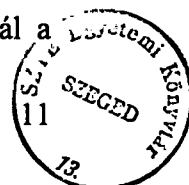
**3. ábra:** Fémek szubcelluláris megoszlása fiziológiás állapotban (A) és fémindukciót követően (B).  $Me^{2+}$ : a szervezetbe került kétértékű fém, a vastag vonalak a fémionok fluxusának irányát és relatív koncentrációját jelzik (Roesijada 1992).

## A metallothioneinek funkciói

Az MT-eket több mint 45 éve azonosították először, azonban a mai napig nem sikerült precízen megfogalmazni a funkciójukat. Nagy fémkötő kapacitásuk valamint a fém-thiolát kötések jellege azt sugallja, hogy egyik fontos szerepük az esszenciális fémek homeosztázisának fenntartása. Az MT-ek általános jelenléte a sejtekben, az, hogy géncsaládokat alkotnak és expressziójuk szigorú időbeni és szövetspecifikus szabályozottságot mutat, továbbá, hogy a gerinces MT-ek elsődleges szerkezetét igen nagyfokú konzerváltság jellemzi, mind arra utal, hogy jelenlétük létfontosságú a szervezet zavartalan működése szempontjából.

### *Az MT-ek szerepe az esszenciális fémek tárolásában, elosztásában és szállításában*

Fiziológiás körülmények között az esszenciális fémek közül a Zn fordul elő legnagyobb mennyiségben MT-kötött formában. A Zn ionok nélkülözhetetlenek több mint 300 különféle enzim natív szerkezetének kialakításához és/vagy katalitikus aktivitásuk kifejtéséhez. DNS kötő fehérjestruktúrák építőköveiként (*Zn finger* transzkripció faktorok) jelentős szerepet töltenek be a génexpresszió szabályozásában is. Az MT-ek mind Zn donor, mind Zn akceptor molekulákként szolgálhatnak ezekben a szabályozó folyamatokban; *in vitro* kísérletekben az apo-MT Zn elvonás következményeként képes inaktíválni az Sp1 és TFIIIA transzkripció faktorok DNS kötő képességét, míg Zn-MT jelenlétében visszafordítható a folyamat (Zeng 1991). Más esetekben apo-MT-ek állították helyre a metalloenzimek aktivitását, elvonva a nem katalitikus, gátló helyekhez kötődött fémeket (Maret 1999). A Zn ionok kontrolálják maguknak az MT géneknek az expresszióját is az MRE regulációs szakaszhoz kötődő MTF fehérjéken keresztül (Palmiter 1994). Alacsony Zn koncentráció esetén, illetve Zn hiányában, az MTF komplexet képez egy Zn érzékeny fehérjével, az MTI-el (*MT transcription inhibitor*). Megemelkedett Zn tartalom hatására az MTI ledisszociál a





szabályozó fehérjéről, így az kötődni képes a promóter régió MRE szakaszaihoz, s ezzel aktiválja az MT transzkripcióját. Az újonnan szintetizálódott MT köti a Zn ionokat és az MTF/MTI komplex újra formálódik.

A Zn-hez hasonlóan, a Cu is esszenciális számos enzim szerkezetének és katalitikus tulajdonságainak kialakításához. Ez utóbbi feladatot különleges elektronszerkezete miatt, főként redox reakciók enzimeinek - pl. a Cu/Zn szuperoxid dizmutáz, citokróm c oxidáz, lizil-oxidáz, cöruoplazmin - kofaktoraként látja el. Emiatt megfelelő mennyiségű Cu jelenléte a szervezetben nélkülözhetetlen többek között a sejtlégzés, a szabadgyökök elleni védekezés és a sejtek vas metabolizmusának folyamataiban.

Az MT-ek fontos szerepet játszanak az esszenciális fémionok (Zn, Cu, Fe) megfelelő időbeni és szöveti eloszlásának biztosításában, mivel -SH csoportjaik által képesek a fémionok gyors megkötésére, tárolására és szükség esetén leadására. Az apo-MT-ek magas -SH csoport tartalmuk és azok fémionokhoz való nagy affinitása következtében jelentős fém akceptorként viselkednek. A kötött fémionok, az -SH csoportok nagy reaktivitása miatt egy folyamatos transzfer reakció részei, mivel Cys-Fém(II)-Cys keresztkötések állandó felbomlása és újraszerveződése lehetővé teszi a fémionok kicserélődését. Ez végbemehet egy MT molekula egyetlen centrumán belül vagy centrumai között, továbbá az MT molekulák, illetve az MT és más metalloproteinek között. Az MT-ek fémkötésének ezen nagyfokú affinitása és dinamikus fluktuációja teszi őket alkalmassá arra, hogy döntő szerepet töltsenek be az esszenciális fémek homeosztázisának fenntartásában.

Az alapállapotban szintetizálódott MT-ek elsősorban cinket és rezet kötnek, melyeket könnyen kiszoríthatnak olyan fémionok, melyek nagyobb affinitással képesek kötődni a fehérjékhez ( $Zn < Cd < Cu < Ag < Hg$ ). Így például Cd expozíció esetén a Cd

folyamatosan kiszorítja a Zn-et a Zn-Cu-MT molekulákból, miközben az egyes fehérje molekulák egy adott időpontban mindhárom fémeket is tartalmazhatják. Az MT-hez kötött fémek aránya erősen függ a szervezetbe került nem esszenciális fémek koncentrációjától, a fémfelvétel körülményeitől, továbbá erős faj és szövetspecifitás jellemző rájuk.

### *Az MT-ek detoxifikáló szerepe nehézfém expozíció esetén*

Az esszenciális fémek hatása a biológia rendszerekben kettős (Roesijadi 1992): egyfelől jelenlétük nyomnyi mennyiségben elengedhetetlen a különböző életfolyamatokhoz, míg a fiziológiásnál nagyobb koncentrációban vagy folyamatos expozíció esetén toxikussá válnak a szervezet számára. Ennek egyik oka az, hogy nagy affinitással kötődnek az enzimek szulfhidril- és amino-csoportjaihoz, anionos oldalláncaihoz és közvetlenül, vagy a fehérje konformáció megváltoztatásával közvetve, gátolják az enzimek katalitikus aktivitását.

A biológiai funkcióval nem rendelkező nehézfémek (Cd, Pb, As, Hg) hasonló mechanizmuson keresztül kifejtve hatásukat, már kis koncentrációban is toxikusak lehetnek. Ezek a „szennyező nehézfémek” a szervezetbe kerülve nem egyenletesen oszlanak meg a különböző szövetek között. Ennek fő oka a szövet-specifikusan jelenlévő ligandok eltérő fémkötő kapacitása (De Conto Cinier és mtsi, 1998). Másodlagos hatásként a sejtekben felhalmozódó fémek reaktív oxigén szabadgyökök képződését katalizálják, melyek erősen oxidáns szerves és szervetlen peroxidok képződéséhez vezetnek. Egyes nehézfémek a genetikai anyag károsodását is előidézhetik (pl. DNS lánc törése), így többségük karcinogén.

### *Kadmium detoxifikáció*

A WHO (WHO/IPCS 1992) besorolása szerint a Cd az első nyolc karcinogén ágens között szerepel. Környezetünkben való fokozódó felhalmozódása az ipari

tevékenység következményeként (pl. galvanizációs eljárások, festék pigmentek előállítása, elemek és akkumulátorok gyártása, cink és ólombányászat stb.) egyre nagyobb gondot okoz. Az akut Cd expozíció elsősorban a májat és a tüdőt károsítja, míg a tartós Cd terhelés esetén a vese és a csontozat az, ahol a legsúlyosabb elváltozások történnek (Goering és Klaassen 1984). Emberben, a vese tubulusok károsodása talán a legáltalánosabban jelentkező betegség Cd expozíció következtében. Japán egyes területein oly mértékű a talaj Cd szennyezettsége, hogy jelentős mennyiség akkumulálódik az emberi fogyasztásra termelt rizsben. Belgium, Kína, és Németország egyes területein a népesség olyan mértékű Cd expozíciónak van kitéve, mely vesekárosodást eredményez. Egy felmérés adatai szerint a föld összlakosságának 7 %-ánál jelentkezett a szervezetben felhalmozódó Cd-ra visszavezethető vese károsodás (Jarup 1998).

Azon tényezők, melyek szerepet játszanak a Cd felvételben, a szövetekben való megoszlásában és a kiválasztásában még nem teljesen felderítettek. Az MT-ek szerepét a Cd semlegesítésében, kiválasztásában azonban számos kísérleti eredmény alátámasztotta. Különböző MT-transzgenikus egér modelleket használva valószínűsíthető, hogy az MT nem befolyásolja a Cd bélcsatornán keresztül történő felvételét, sem pedig annak kezdeti eloszlását a különböző szövetek között. Azonban a Cd, Cd-MT formában történő kiválasztása az epébe jelentősen csökkenti a nehézfém toxikus hatását, megvédve ezzel a szervezetet, különös tekintettel a vesét, a különböző szöveti károsodásoktól (Liu és mtsi, 1996; Liu és Klaassen 1996). Az MT-I-et túltermelő transzgenikus egerek, melyek májában a kontroll állatok MT szintjének tízszeresét mérték, rezisztensnek bizonyultak a Cd okozta májkárosodással, illetve halálozással szemben (Michalaska 1993; Masters 1994). Ugyanakkor azok az egerek, melyek nem hordozták az egyik MT allélt sem, fokozott érzékenységet mutattak a Cd



indukálta károsodásokra (Leber és Miya 1976; Liu és mtsi, 1996). Normál állatok előkezelése olyan alacsony dózisban használt kemikáliákkal, melyek bizonyítottan növelik az MT mRNS szintet (Cd, Zn, etanol, stb.) védettséget biztosít az emelt dózisú Cd hatásával szemben (Leber és Miya 1976; Goering és Klaassen 1984). Hasonló előkezelések az MT génekre mutáns egerekben, azonban nem biztosítanak védettséget a Cd kezelés májkárosító hatásaival szemben (Leber és Miya 1976; Liu és mtsi, 1996). Az MT-ek által közvetített hatékony Cd kiválasztás amellett, hogy pajzsként szolgál a májkárosodással szemben, aktív védelmet biztosít más kritikusan érintett szövetek számára is, csökkentve a hozzáférhető Cd mennyiségét. Az MT génekre mutáns egerekben Cd kezelés következményeként fokozott vese károsodás (Liu és mtsi, 1998), és a csonttritkulás is kimutatható (Bhattacharrya és mtsi, 1998; Habeebu és mtsi, 1998).

#### *Arzén detoxifikáció*

Az arzén, hasonlóan más nehézfémekhez, az élő szervezetekbe kerülve annak károsodását idézheti elő (máj megnagyobbodás, tumor képződés, sejt degeneráció, stb.). Nagy affinitással kötődik a fehérjék szulfhidril csoportjaihoz, ezzel gátolva a -SH függő enzimek működését (Webb 1987). Bár az MT-ek ugyancsak thiol csoportok révén kötik a nehézfémeket, arzénnel való kölcsönhatásuk jellegéről az élő szervezetben még nem sok adat látott napvilágot. Az arzén öt vegyértékű alakja a sejtek redukív feltételei közt a toxikusabb  $As^{3+}$ -á redukálódik, majd az arzenit a májban kevésbé toxikus szerves formává alakul át és kiválasztódik (Eller-Essen és Crivello 1998).

Patkányban az *in vivo*  $As^{3+}$  és  $As^{5+}$  kezelések dózisfüggő MT mRNS és fehérje szintnövekedést eredményeztek. A közvetlen arzenit bevitel mindig hatékonyabb válaszreakciót váltott ki, mint a hasonló dózisban alkalmazott arzenát (Albores és mtsi, 1992). Ugyancsak patkányon végzett kísérletek eredménye szerint, ha az  $As^{3+}$  bevitt a szervezetbe Zn kezelés előzte meg, az arzenit nem okozott növekedést az MT mRNS

szintben, míg az MT fehérje mennyisége a duplájára emelkedett. A szerzők feltételezik, hogy az arzén az MT expressziót poszt-transzkripció szinten is befolyásolja, az mRNS-ek fokozott translációja, illetve az MT fehérjék stabilizálása révén. Ez utóbbi lehetőséget támasztja alá az a megfigyelés, hogy az arzén gátolja a lizoszómális enzimek aktivitását és az ubiquitin függő fehérje degradációt (Albores és mtsi, 1992).

Ismert, hogy MT indukciót idézhetnek elő a sejtekben felszabaduló reaktív szabad gyökök is. *In vitro* megfigyelések rámutattak, hogy a  $\text{NaAs}^{3+}$  metabolizmusának termékeként szabadgyökök keletkeznek, melyek gátolják a DNS *repair* rendszer működését, és a DNS szál törését eredményezik (Petito és Beck 1990). Az arzén által indukált metallothioneinek szulfhidril csoportjaik oxidálódása révén védelmet biztosíthatnak a szabadgyökök okozta DNS károsodásokkal szemben is.

Bár az MT-ek főként citoplazmatikus fehérjeként ismertek, néhány kísérlet során kimutatták jelenlétüket a sejtmagban is, a G1 fázisból az S fázisba való átmenet során (Cherian 1994). Az MT fehérjék nem tartalmaznak sejtmagi lokalizációs szignált, transzlokációjuk módja még nem teljesen tisztázott, de jelenlétük a sejtmagban csak erősíti azt a feltételezést, hogy részt vesznek az örökítő anyag védelmében, illetve, hogy fontosak a DNS replikációban, transzkripcióban és RNS *processing*-ben résztvevő, Zn függő fehérjék számára.

## II. Stresszfehérjék

Az előző fejezetben tárgyalt metallothioneinek családja csak egyik eleme annak a molekuláris szintű védekezési rendszernek melyek meglete szinte nélkülözhetetlen a szervezet számára a környezeti változások káros hatásaival szembeni túléléshez (pl. különböző toxikus anyagok felhalmozódása, fizikai paraméterek, mint pl. a hőmérséklet, oxigén tartalom, ozmotikus nyomás változásai, stb.). Régi megfigyelés

például, hogy a sejtek hirtelen hőmérsékletváltozás hatására jellegzetes fehérjemolekulák szintézisével válaszolnak. A jelenséget hősokk válasznak, a fehérjéket pedig hősokk (HSP) vagy stressz fehérjéknek nevezték el. Ez a celluláris stresszválasz evolúciósan rendkívül konzervált, megfigyelhető a baktériumoktól a növényeken át egészen az emberig és magukat a hősokk fehérjéket is nagyfokú homológia jellemzi. A folyamat összetettségére jellemző, hogy ezen fehérjéknek a szintézise nemcsak hőmérsékletváltozással, hanem más stresszhatásokkal is indukálható (pl. nehézfémek, fertőzések, xenobiotikus metabolitok stb.). A hősokk egyik legfontosabb negatív következménye a fehérjék denaturációja, de denaturációt okoznak a sejtben például a nehézfémek is, amelyek a fehérjék felületi szulfhidril csoportjaihoz és anionos aminosav oldalláncaihoz kötődnek. Az ionos vagy hidrofób tulajdonságú peszticidek, a fehérjemolekulák megfelelő aminosav oldalláncaihoz kapcsolódva megváltoztatják a felületi töltéeloszlást, illetve a natív térszerkezetet kialakító oldallánc-kölcsönhatások jellegét, és denaturálják a fehérjét. Ezek alapján feltételezhető volt, hogy a stresszválaszt a denaturált vagy rendellenes térszerkezetű fehérjék jelenléte váltja ki. Erre az első közvetlen bizonyítékot Anathan és munkatársai adták 1986-ban, amikor torz szerkezetű fehérjéket injektálva a sejtbe hősokk fehérjék fokozott szintézisét idézték elő. A hősokk fehérjék elősegítik a denaturált fehérjék felismerését, natív szerkezetük helyreállítását vagy eltávolításukat a traumatizált sejtből.

A stresszfehérjék kiemelkedő fontosságára utal az a tény is, hogy jelenlétük nem csupán a fiziológiástól eltérő körülmények között jelenthet védelmet, hanem alapvető életfunkciók ellátásához is nélkülözhetetlenek a sejtek számára, például segíthetik a protein komplexek összerakását, illetve szétszerelését normál körülmények között is.

A stresszfehérjék legáltalánosabb besorolása a molekulatömegük alapján történik; ily módon megkülönböztetjük a Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 és a kis

molekulatömegű Hsp-k családjába tartozó fehérjét. Csoportosíthatók még fokozott szintézisük kiváltó oka szerint (pl. hősokk fehérje, glükóz regulált fehérje), vagy szekvencia homológiájuk, illetve a funkciójuk alapján (Morimoto és mtsi, 1994). A stresszfehérjék egy csoportja a fehérjék funkcióképes térszerkezetének kialakításában való aktív közreműködésük miatt a molekuláris *chaperone* elnevezést kapta (Ellis 1987). A *chaperone*-ok maguk nem részei az aktív struktúrának, de *in vivo* elősegítik annak kialakulását, illetve megszüntetését. Meg kell jegyeznünk, hogy nem minden stresszfehérje bír *chaperone* funkcióval és vannak *chaperone*-ok amik nem feltétlenül stresszfehérjék (Hartl 1996).

### **A 90 kDa molekuláris *chaperone* fehérjecsalád**

A Hsp90 a citoplazma legnagyobb mennyiségben előforduló stresszfehérjéje, az itt található fehérjék akár 1-3% -át is kiteheti (Jakob és Buchner 1994). Ugyanakkor a Hsp90 fehérjék mintegy 5-8 %-a a sejtmagban mutatható ki. Egyre több jel utal arra, hogy a fehérje populáció egy része ingázik a citoplazma és a sejtmag között (Csermely és mtsi, 1998).

A *hsp90* gént, géneket széles körben izolálták már a baktériumoktól kezdve az emberig (Nover és Schaf 1991; Parsell és Lindquist 1993; Jakob és Buchner 1994; Morimoto és mtsi, 1994; Jonshon és Craig 1997). Míg egyes fajokban, mint például az *Escherichia coli* és a *Drosophila*, a családnak csak egy tagja ismert, addig számos gerincesből (*zebrafish*, csirke, sertés, egér, ember) két izoformát, a Hsp90 $\alpha$ -t és Hsp90 $\beta$ -t azonosították (Catelli és mtsi, 1985; Moore és mtsi, 1987; Hoffmann és Hovemann 1988; Hickey és mtsi, 1989; Rebbe és mtsi, 1989; Krone és Sass 1994). A két izoforma (paralógok) nagy hasonlóságot mutat egy adott fajon belül, például emberben, egérben és csirkében az  $\alpha$  és  $\beta$  fehérjék közötti azonosság 85-86 %. Azonban

ha az ortológ megfelelőket hasonlítjuk össze, még ennél is nagyobb aminosav sorrendbeli azonosságot tapasztalunk, például az emberi Hsp90 $\alpha$  95-99 %-os homológiát mutat a csirke, egér és hörcsög Hsp90 $\alpha$  fehérjéivel. Hasonlóan magas az azonosság a különböző fajok  $\beta$  izoformái között is (94-99 %). A két izoforma valószínűleg egy génduplikáció eredményeként jött létre a gerincesek megjelenésével közel egy időben, úgy 500 millió évvel ezelőtt (Moore és mtsi, 1987).

### **A *hsp90* gének szerkezete és expressziójuk**

Az izoformákat kódoló gének, a *hsp90 $\alpha$*  és a *hsp90 $\beta$* , két különböző kromoszómára lokalizálhatók az emberben (Ozawa és mtsi, 1992; Durkin és mtsi, 1993) és egérben is (Moore és mtsi, 1987; Moore és mtsi, 1989), ahol *hsp86*-nak és *hsp84*-nek nevezik az ortológokat. Nagyfokú szekvencia homológia jellemzi a két kódoló régiót, egérben például a *hsp86* és *hsp84* gének nukleotid szekvenciája 76 %-os azonosságot mutat a transzlálódó szakaszon. Az 5' és 3' nem kódoló régiók jellegzetes különbségeket hordoznak, például egérben a *hsp84* gén 5' nem transzlálódó szakasza (UTR) mindössze 94 bp hosszú és ebben a régióban nem található ATG triplet (Moore és mtsi, 1987), szemben a *hsp86* gén 260 bp hosszú 5' UTR szekvenciájával mely hat extra Met kodont is hordoz (Moore és mtsi, 1989).

Az eddig azonosított *hsp90* géneknek számos közös jellemzőjük is van. Eltérően sok más *hsp* géntől valamennyi *hsp90* strukturgén hordoz intront. Míg a *Drosophila* génben egyetlen hosszú intron található az 5' régióban (Blackman és Meselson 1986), magasabb rendű gerincesekben számuk növekszik, emberben például 11 intron tördeli szét a kódoló szekvenciát (Rebbe és mtsi, 1989). Az intronok szekvenciái nem mutatnak jelentős hasonlóságot sem a paralog sem az ortológ formák között, azonban pozíciójuk konzervált, még a *Drosophila hsp90* gén egyetlen intronjának a pozíciója is megegyezik



az ember, egér, csirke *hsp90* gének első intronjával. Közös jellemzője még az eddig azonosított strukturgéneknek, hogy a funkcionális transzlációs start kodon minden esetben a második exonban található. Számos magasabb rendű *hsp90* gén promóter régiójában az expresszió szabályozásában résztvevő szekvenciák (HSE: *Heat Shock Element*, CAAT szekvenciák és Sp1 kötő helyek) a TATA *box* közvetlen közelében, 650 bp-on belül találhatók, valamint az első intron is hordoz szabályozó elemeket (pl. emberben 3 funkcionális HSE található itt). Ettől a „szabálytól” eddig egyetlen eltérés ismert, a csirke *hsp90β* gén szabályozó régiója, ahol a HSE és CAAT szekvenciák ~ 2 kb-ra találhatók a transzkripció iniciációs ponttól, és az első intron nem hordoz HSF (*Heat Shock Factor*) kötő helyeket (Meng és mtsi, 1995). Feltételezhető, hogy ezek az eltérések játszanak szerepet a csirke *hsp90β* gén alacsony szintű alap expressziójában és a különböző induktorok (pl. hősök, növekedési faktor) jelenlétére való válaszadás képességének hiányában (Meng és mtsi, 1993).

A két gént jellemző nagyfokú szekvenciahomológia ellenére a szabályozó mechanizmusuk valószínűleg jelentősen eltér; expressziós mintázatuk karakterisztikus az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban, a sejt differenciálódás során és stressz helyzetekben. A *hsp90β* többnyire konstitutívan expresszálódik és stressz hatására kevésbé indukálódik, míg a *hsp90α*, bár jelen van normál körülmények között is a sejtben, különböző stressz helyzetekben jelentős mértékben indukálódik. A paralóg *hsp90* formák megjelenése egy evolúciós előnyt jelenthetett a gerincesek számára, mivel az egyik gén megtarthatta eredeti funkcióját, míg a másik forma „szabadon” mutálódhatott és vált alkalmassá egyéb feladatok ellátására. Vessük össze az evolúció néhány lépcsőfokán a Hsp90 fehérjék szerepét az élő sejtben; az *Escherichia coli* baktériumban a Hsp90 nem esszenciális fehérje, hiánya nem befolyásol létfontosságú funkciókat még stressz helyzetben sem (Bardwell és Craig 1988). Élesztőben, a

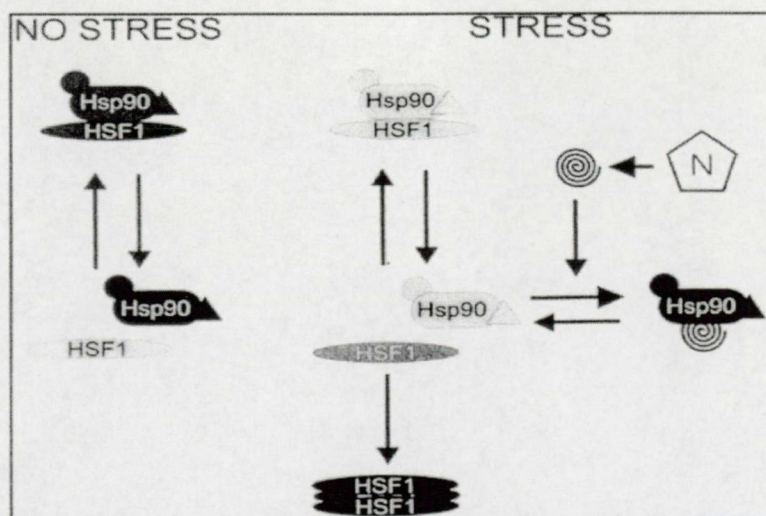
gerincesekhez hasonlóan két izoformát különítettek el (Hsp90 és Hsc90), a két gén bármelyike eltávolítható anélkül, hogy az élesztő életfunkciói sérülnének, azonban együttes hiányukat már nem képes tolerálni a sejt (Farely és Finkelstein 1984). Gerincesekben jó példa a két fehérje funkcionális divergenciájára az a transzgenikus egérkísérlet, ahol a *hsp90 $\beta$*  génben mutáns homozigóta embriókban a Hsp90 $\beta$  kulcsfontosságú szerepét a placenta fejlődésében a Hsp90 $\alpha$  nem képes átvenni, és így a mutáció már az embrionális fejlődés korai szakaszában letális (Voss és mtsi, 2000). Az élesztőben azonosított kétféle *hsp90* géntermék 98 %-os homológiát mutat, szemben a gerincesek 85-86 %-ával. Feltételezhető, hogy élesztőben a génduplikáció a gerincesekben lejátszódó eseménytől függetlenül, azokénál jóval későbbi időpontban következett be (Moore és mtsi, 1989), és ez magyarázhatja azt, hogy ebben a fajban a két fehérje még képes egymás funkcióját ellátni.

Érdekes Palmisano gondolatmenete a génduplikáció további lehetséges előnyeiről. Szerinte nem elképzelhetetlen, hogy az új Hsp90 kapacitás tette lehetővé olyan kriptikus fehérjék „megmentését” is, mely hozzájárulhatott új morfológiai formák, mint például az állkapocs megjelenéséhez az evolúció során (Palmisano és mtsi, 1999).

### **A *hsp90* gén expressziójának szabályozása**

A sejtek gyors válaszadó képessége a különböző stressz helyzetekben magában foglalja a *hsp* gének azonnali transzkripciók aktiválódását. A szabályozó mechanizmus fontos elemei a HSF fehérjék, melyek „nyugalmi” állapotban a citoplazmában és a sejtmagban monomer, DNS kötő aktivitással nem rendelkező formában vannak jelen. A sejtet ért változást követően a HSF fehérjék aktiválódnak: a monomer formák homotrimerré kapcsolódnak össze. Ebben a formában felismerik és kötődni képesek a *hsp*

promóter régiók specifikus DNS szekvenciáihoz (HSE) ami fokozott *hsp* génexpressziót indít meg (Wu 1995; Morimoto és mtsi, 1996). Stressz mentes állapotban a HSF fehérjék monomerként egy stressz fehérjéhez, nagy valószínűséggel a Hsp90-hez kötöttek (Zou és mtsi, 1998). A Hsp90 *chaperone* (magában vagy egy *chaperone* komplex tagjaként) represszálja a HSF működését. A sejtet ért stresszhatás következtében a natív szerkezetükben károsodott fehérjék felhalmozódnak, és kompetícióban a HSF fehérjékkel kötődnek a Hsp90-hez. Ennek eredményeként megemelkedik a szabad HSF monomer szint, következésképpen lehetővé válik a koncentrációfüggő trimerizáció és megindulhat a fokozott *hsp90* transzkripció. A megnövekedett Hsp90 szint ismét lehetővé teszi a Hsp90-HSF komplex kialakulását, majd a transzkripciós faktor ledisszociál a DNS-ről és monomer, DNS kötő aktivitással nem rendelkező formában lesz jelen a sejtmagban és a citoplazmában. Ilyen módon egy autoregulációs körben a Hsp90 önmaga expressziójának negatív szabályozó eleme (4. ábra).



**4. ábra:** Modell a Hsp90 szerepéről a HSF1 szabályozásában. Az árnyalatbeli különbségek a fehérjék illetve komplexeik relatív koncentrációját jelzik (Zou és mtsi, 1998).

Élesztőben, a *hsp90α* gén promóter régiójában két HSE szekvencia található a TATA *box* környezetében, a második reguláló szakaszhoz csak stresszhatást követően kötődik a HSF faktor (Erkine és mtsi, 1995). Az ember *hsp90α* promóter régiójában a számos HSE szekvencia mellett más szabályozó elemek is megtalálhatók (pl. Sp1, SRE: *Serum Response Element*), azt sugallva, hogy emberben több transzkripció faktor jól megkomponált együttműködése szabályozza a gén expresszióját.

### Hsp90 fehérjék szerkezete

A Hsp90 fehérje funkcionálisan aktív formában foszforilált homo-dimerként fordul elő (Rose és mtsi, 1987; Radanyi és mtsi, 1989), de hő sokk hatására a tetra-, hexa- és oktamer Hsp90 formák is felszaporodnak. Bár a fehérje elsődleges szerkezete már az 1980-as évektől ismert (Farrelly és Finkelstein 1984) különböző szegmenseinek funkcionális elemzése még közel sem fejeződött be. Két jól megkülönböztethető *domain*-jét egy erősen töltött, flexibilis, ún. *hinge* régió kapcsolja össze (Koyasa és mtsi, 1986; Itoh és Tashima 1993).

Az N-terminális *domain* felelős a nukleotid - leginkább ATP - kötésért (Prodromou és mtsi, 1997), továbbá különböző peptid és fehérje kölcsönhatásokban vesz részt (Young 1997), valamint specifikusan köt egy anti-tumor hatású vegyületet, a geldanamicint (Stebbins és mtsi, 1997; Grenert és mtsi, 1997). Az N-terminális *domain* működésének gátlása geldanamicinnel hasznos eszközként szolgál a stresszfehérje különböző szegmenseinek jellemzéséhez.

Az összekötő, középső *domain* specifikus az eukarióta Hsp90 fehérjékre (Gupta 1995). A stresszfehérjének ez a régiója vesz részt a szteroid receptorokkal (Tbarka és mtsi, 1993; Cadepond és mtsi, 1993), aril-hidrokarbon recepttorral (Carver és mtsi, 1994; Whitelaw és mtsi, 1995) és a protein kinázokkal létesített kapcsolatokban

(például CK-II, v-Src, Raf, eIF-2- $\alpha$ , Jove és mtsi, 1986; Szyszka és mtsi, 1989; Stancato és mtsi, 1993; Miyata és Yahara 1995). Valószínűleg más fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására is képes a két aminosav (lizin és glutaminsav, un. KEKE motívum) váltakozásával kialakított felszínével (Realini és mtsi, 1994).

A C-terminális *domain* felelős a dimerizációért (Minami és mtsi. 1994; Meng és mtsi, 1997) és nagy valószínűséggel részt vesz más fehérjékkel való kapcsolatok kialakításában is, hozzájárulva a Hsp90 fehérje *chaperone* funkciójához (Sullivan és mtsi, 1985, Cadepond és mtsi, 1993).

A Hsp90 stresszfehérje tehát nem egy, hanem jó néhány fehérjekötő helyet tartalmaz, melyek más és más peptidek és fehérjék megkötésére képesek. Feltételezhető, hogy a stresszfehérje N- és C-terminális *domain*-jei egymással is kölcsönhatásba kerülnek funkciójuk betöltése során (Prodamou és mtsi, 1997; Stebbins és mtsi, 1997) illetve, hogy a három fehérjekötő *domain* egymással koordináltan vesz részt különböző peptid szegmensek kötésében (Csermely és mtsi, 1997).

### **A Hsp90 fehérjék lehetséges funkciói a sejtben**

A Hsp90-et jellemző sokféle kötőfelszín és az ebből következő változatos kölcsönhatások a fehérje több celluláris folyamatban való részvételét feltételezi. Alább csupán néhányat emelnék ki a Hsp90 stresszfehérje lehetséges feladatai közül.

Mai ismereteink szerint a Hsp90 molekulák képesek megakadályozni számos, a megfelelő harmadlagos szerkezetét még fel nem vett, illetve abban károsodott fehérje aggregációját (Wiech és mtsi, 1992; Jakob és mtsi, 1995), azonban a Hsp90 önmagában nem elégséges a részlegesen denaturált fehérjék megfelelő térszerkezetének helyreállításához (Freeman és Morimoto 1996). A Hsp90 az egyik legnagyobb „fehérjetekero” apparátust, a foldoszómat szervezi egybe, ami különféle stresszfehérjéket magába foglaló egység, és felelős számos jelátvitelben



nélkülözhetetlen fehérjemolekula funkcionális struktúrájának kialakításához (Pratt 1997).

A foldoszóma jelenléte nélkülözhetetlen jó néhány - ha nem valamennyi - kináz érési folyamatához (v-Scr kináz, Xu és Lindquist 1993, Jove és mtsi, 1986; Raf kináz, Stancato és mtsi, 1993, van der Straten és mtsi, 1997; eIF-2 $\alpha$  kináz, Uma és mtsi, 1997). Ez a stresszfehérje komplex segíti a kinázok korrekt térszerkezetének kialakulását, és aktiválásra kész állapotban tartja őket; például a v-Scr kináz Hsp90 kötött állapotban nem rendelkezik kináz aktivitással, disszociációjukat követve mindkét fehérje foszforilálódik, melynek következtében a v-Scr aktiválódik (Mimnaugh és mtsi, 1995). A Raf kináz érési folyamatában részt vevő Hsp90 valószínűleg kölcsönhatásban marad a kináz membrán-kötött aktív formájával is, védve azt az inaktiválódástól (Wartmann és Davis 1994; Schulte és mtsi, 1995). Ha valami oknál fogva a stresszfehérje-kináz komplex érési folyama idő előtt megszakad, például geldanamicin jelenlétében, a kinázok disszociálnak és nagy valószínűséggel a citoplazmában degradációnak esnek áldozatul (Schulte és mtsi, 1996, 1997).

A Hsp90-chaperone komplex kötődik a szteroid receptor hormon-kötő egységéhez is (Pratt 1997; Pratt és Toft 1997) és ezzel stabilizálja azt a receptor struktúrát, melyhez a hormon nagy affinitással képes kötődni. A szteroid molekula receptorhoz való kötődése destabilizálja annak kapcsolatát a stresszfehérje komplex-el, minek következtében a köztük lévő kötődés gyengül, de a mai ismereteink szerint feltételezhető, hogy nem szűnik meg teljesen (Galigniana és mtsi, 1998). Ezután a szteroid receptor a citoplazmából a sejtmagba jut, és ott a megfelelő DNS szakaszokhoz kötődik. Mivel a sejtmagba jutás megakadályozható geldanamicin kezeléssel (Czar és mtsi, 1997), ami többé-kevésbé specifikusan gátolja a Hsp90 működését, lehetséges, hogy a stresszfehérje komplex egészen a sejtmagba kíséri a receptor molekulákat. A

szteroid indukálta génexpresszió megszüntetésében is a Hsp90 *chaperone* komplex jelenlétét feltételezhetjük, mivel a stresszfehérje(ék) segítheti(k) a receptor-DNS kölcsönhatás megszűnését és a szteroid receptor citoplazmába történő visszajutását is (Liu és Defranco 1999).

A szteroid receptorokhoz hasonlóan az aril-hidrokarbon receptorok érési folyamatához is szükséges a Hsp90 jelenléte (Carver és mtsi, 1994); a Hsp90-*chaperone* komplexnek a receptor hidrofób felszínéhez való kötődése biztosítja a ligand kötődéséhez megfelelő szerkezetet. Azonban míg a szteroid receptorok *zinc-finger* DNS kötő *domain*-je nem lép kapcsolatba a Hsp90 molekulákkal, addig az aril-hidrokarbon receptor *helix-loop-helix domain*-je stabil komplexet képez a Hsp90 fehérjével (Antonsson és mtsi, 1995). Így a sejtmagba került receptor DNS-hez kötődésének előfeltétele a Hsp90 molekula disszociációja.

Holley és Yamamoto 1995-ös munkájukban valószínűsítik, hogy valamennyi sejtmagi hormon receptor érési/jelátviteli folyamatában a Hsp90 stresszfehérjének szerepe van. A hormon receptorok mellett a Hsp90 kötődik más transzkripciós faktorokhoz is; a citoplazmában kialakuló stresszfehérje-transzkripciós faktor komplexek jelenléte utalhat arra, hogy a Hsp90 része ezen DNS kötő fehérjék érési folyamatának. Ezen túlmenően néhány megfigyelés alapján feltételezhető, hogy a Hsp90 kölcsönhatásba lépve a transzkripciós faktorral befolyásolja annak funkcióját. Ha a stresszfehérje egy „laza” átmenti komplexet képez az adott transzkripciós faktorral, akkor fokozza annak DNS-sel való kölcsönhatását (MyoD, E12, Shaknovich és mtsi, 1992; Shue és Kohtz 1994). Ezzel ellentétben, ha a Hsp90 és a transzkripciós faktor stabil komplexet képez, akkor csökken vagy teljesen gátolt a DNS-hez való kötődés. Binart és munkatársai még 1989-ben felvetették, hogy a Hsp90 molekulák középső, töltéssel rendelkező aminosavakat hordozó *domain*-je DNS szerkezetre emlékeztet.

Másik lehetséges mechanizmus az, hogy a Hsp90 molekulák módosítják a DNS-fehérje kölcsönhatást, ha a stresszfehérje és a DNS kompetícióban van a transzkripció faktor DNS kötő felszínéért (Miyata és Yahara 1995).

A fent említett példák alapján a Hsp90 molekula illetve a Hsp90-*chaperone* komplex nagy valószínűséggel részt vesz egyes fehérjék sejtmagba történő transzportjában. Így az sem meglepő, hogy a Hsp90 fehérje felismeri és köti az NLS (*Nuclear Localization Signal*) szekvenciákat (Chambrud és mtsi, 1990; Schlatter és mtsi, 1992; Csermely és mtsi, 1995).

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Kísérleti állatok és kezelési körülmények*

Valamennyi a dolgozatban leírt kísérletet ponttyal (*Cyprinus carpio*) végeztük el. A halakat a Tiszai Halgazdaság Fehértói Telepéről szereztük be 1997 januárja és 2001 decembere között. A halakat a kezelések előtt 400 l-es jól levegőztetett kádakban akklimatizáltuk, 2-3 hét időtartamig. A kádak vizét hetente kétszer cseréltük. A kezelésekhez a halakat 100 l-es akváriumokba helyeztük át (mérettől függően 2-3 hal/akvárium). Minden kísérletet legalább két időpontban (az egymást követő évek közel azonos időszakában) megismételtünk, a kezelések minden mintavételi pontjában három vagy négy egyedet használtunk fel a mérésekhez. Az izolált szövetmintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig.

### *Fémkezelések*

A kezelésekhez használt fémkoncentrációt fémionra vonatkoztatva adjuk meg. Ezek minden esetben 1 és 10 mg/l végkoncentrációt jelentettek, kivéve a Cd-al történő intraperitoneális kezelést, ahol 10 mg/testsúly kg dózist alkalmaztunk. A kezelés során a vízhőmérsékletet  $12-15^{\circ}\text{C}$  között termosztáltuk, a halak 0.7-1 kg súlyúak voltak, kivéve az arzén-kezelést, amihez 0.5 kg körüli egyedeket használtunk.

A kadmiumot kadmium acetát (Fluka) formában használtuk, a mintavétel 0, 24, 48, 72, és 168 óra, illetve 0, 6, 24, 48, 72 és 96 óra elteltével történt. Az intraperitoneális kezelés során 0, 2, 6, 12, 24, 48 és 96 órás mintákat vettünk.

A réz (réz szulfát, Reanal) és arzénkezelés (dinátrium hidrogén arzenát, Fluka) hasonló körülmények között történt, a mérési pontok itt mindkét koncentrációnál azonosak voltak (0, 6, 24, 48 és 72 óra).

### ***Hő és hidegsokk***

A hirtelen hőmérsékletváltozás hatásának vizsgálatához a halakat a téli időszakban 12°C-on, nyáron pedig 15°C-on akklimatizáltuk. A hőkezelés 26 és 29°C-on történt, mintát 0.5, 1, 3 és 5 óra elteltével vettünk közvetlenül a hőkezelés után. Minden egyes időpontban néhány egyedet visszahelyeztünk az akklimatizációs hőmérsékletre, és egy óra elteltével szintén izoláltuk a vizsgált szöveteket (*recovery*).

A hidegsokk vizsgálatához a halakat 5°C-os vízhőmérsékletű akváriumba helyeztük át, 0.5, 1, 2, 3 és 5 óra időtartamra. A mintavétel közvetlenül a hidegsokk után, illetve az azt követő 1, 12 és 24 órás, az akklimatizációs hőmérsékleten való inkubáció elteltével történt.

### ***RNS preparálás fagyasztott mintákból***

A fagyasztott vese és máj mintákból ~ 100 mg-nyit, az agy mintákat teljes egészében (teljes agy vagy izolált *olfactory* lebeny, *cerebellum*, és középagy) RNázol B oldatban (Tel-test, Inc. Texas) homogenizáltuk (2 perc, 1500 fordulat), és a gyártótól származó instrukciókat követve össz-RNS-t preparáltunk. Röviden összefoglalva, a homogenizátumokat 2-3-szor extraháltuk kloroformmal és centrifugáltuk (15 perc, 15000 rpm, 2°C), majd a felső, vizes fázisból 0.75 térfogatnyi izo-propanollal precipitáltuk az RNS-t. A csapadékot centrifugálással gyűjtöttük össze (5 perc, 15000 rpm, 4°C) és egy éjszakán át 75 %-os etilalkoholban mostuk, majd DEPC-vel (dietil pirokarbonát, Sigma) kezelt vízben oldottuk fel. Azért, hogy az enzimatis reakciókhoz kellő tisztaságú RNS-t kapjunk, újra precipitáltuk 1/20 térfogatnyi Na-acetát és 2.5 térfogatnyi etilalkohol hozzáadásával. A csapadékot egy éjszakán át 75%-os etilalkohollal mostuk, majd felfuszpendáltuk 50-100 µl DEPC-vel kezelt desztillált vízben. A tisztított RNS mintákat 100 U RNáz mentes DNáz I-el (Boehringer-Mannheim) kezeltük rutinszerűen (2 óra, 37°C).



Az RNS koncentrációjának meghatározására az  $1_{A_{260}} = 40 \mu\text{g/ml}$  RNS összefüggést alkalmaztuk. Amennyiben az  $A_{260}/A_{280}$  arány nagyobb volt 1.8-nél akkor a minta tisztaságát megfelelőnek tekintettük.

### *Az RNS frakcionálása és blottolása*

Northern hibridizációhoz 20  $\mu\text{g}$  totál RNS-t választottunk el 1.2 %-os denaturáló agaróz gélen (Sigma), 1xMOPS pufferben (Sigma). A gélben a formaldehid végkoncentrációja 2.2 M, az ethidium bromidé 0.1  $\mu\text{g/ml}$  volt. Az elektroforetikus szeparálás előtt az RNS mintákat mintafelvívő pufferben (1xMOPS, 6 % formaldehid, 50 % formamid) 55°C-on 15 percig denaturáltuk. A futtatás szobahőmérsékleten történt, 5 V/cm feszültségen. Az elválasztást követően a gél 10xSSC oldattal (20xSSC: 3 M NaCl, 0.3 M trinátrium citrát, pH 7) kapilláris transzferrel vittük át nylon membránra (Amersham), egy éjszakán keresztül. A transzfert követően a filtert 2xSSC-vel öblítettük, majd az RNS-t UV besugárzással rögzítettük a membránhoz (GS-Gene cross-linker, Bio-Rad).

Hibridizáláshoz a DNS próbákat  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP-vel radioaktívan jelöltük, *random priming* technikával (Feinberg és Vogelstein 1983), High Prime DNA Labeling kit-et (Boehringer-Mannheim) használva. A be nem épült nukleotidokat Sephadex G-75 oszlopkromatográfiával távolítottuk el.

A filterek előhibridizálása 4-5 óra hosszan, a hibridizálása 14-16 óra hosszan történt 42°C-on, 50 % formamid, 5xDenhardt's reagens, 5xSSC, 100  $\mu\text{g/ml}$  denaturált bakteriális DNS tartalmú oldatban. A denaturált próbából  $10^9$  cpm/ml végkoncentrációt használtuk a hibridizálásokhoz. A nem specifikusan kötődött próbát 68°C-on 0.1xSSC-t és 0.1% SDS-t tartalmazó oldatban történő mosással távolítottuk el.

### ***Reverz transzkripció (RT)***

A cDNS szintézis 5 µg totál RNS-ből kiindulva 20 µl végtérfogatban történt. A templát RNS-t 500 pmol random hexamer primer (Promega) jelenlétében 90°C-on denaturáltuk, majd 200 U M-MuLV reverz transzkriptáz (Sigma), 20 pmol dNTP keverék (MBI Fermentas) és 1xRT reakció puffer (Sigma) jelenlétében 10 percig 37°C-on, majd 60 percig 42°C-on inkubáltuk. A reakciót 5 perces 65°C-on történő inkubálással állítottuk le, majd -20°C-on tároltuk.

### ***PCR amplifikáció***

A PCR amplifikálásokhoz templátként a RT reakció termékekből 1 µl-t, a genomiális DNS-ből 0.1 µg-ot használtunk fel reakciónként. A reakció elegy a következő komponenseket tartalmazta: 1xPCR puffer/MgCl<sub>2</sub> (Sigma, Zenon), 5 U Taq polimeráz (Sigma, Zenon), 250 µM koncentrációban a négyféle dNTP (Sigma, MBI Fermentas) és 50 pmol a megfelelő primerekből. A PCR amplifikálásokat egy PTC 150-16 MiniCycler-ben (MJ Research) a következő két alap program felhasználásával végeztük el.

#### ***I. alap program***

Első lépés: 1 perc 95°C-on, 2. lépés: (denaturálás) 30 másodperc 95°C-on, 3. lépés: (*annealing*) 30 másodperc 45°C-on, 4. lépés: (szintézis) 30-180 másodperc 72°C, 5. lépés: a 2., 3., és 4. lépés ismétlése 4 alkalommal, 6. lépés: 30 másodperc 95°C-on, 7. lépés: 30 másodperc 55-65°C-on, 8. lépés: 30-180 másodperc 72°C, 9. lépés: a 6., 7., és 8. lépés ismétlése 19-24 alkalommal, 10. lépés: 5 perc 72°C-on.

#### ***II. alap program***

Első lépés: 1 perc 95<sup>0</sup>C-on, 2. lépés: 30 másodperc 95<sup>0</sup>C-on, 3. lépés: 30 másodperc 55-65<sup>0</sup>C, 4. lépés: 30-180 másodperc 72<sup>0</sup>C-on, 5. lépés: a 2., 3., és 4. lépés ismétlése 24-29 alkalommal, 6. lépés: 5 perc 72<sup>0</sup>C-on.

A programokon belül, az *annealing* hőmérséklet és a ciklusok száma az adott primer pár függvénye volt, a szintézis reakció idejét pedig az amplifikált termék várható hossza határozta meg. Fél-kvantitatív mérésekhez minden primer párra meghatároztuk az amplifikálási ciklusok maximumát, amíg a szintetizálódott termék mennyisége a ciklusok számával arányosan növekedett. Az általunk használt kísérleti körülmények között a  $\beta$ -aktin primerek esetén 25-28-nak, az MT és hsp90 primereket használva 30-32-nek adódott.

### ***Primerek***

A ponty MT cDNS amplifikálásához tervezett primerek, a CMT3, CMT5 és CMT4, a ponty MT-I (Kito és mtsi, 1997, AF002161), az aranyhal MT (Chan 1995, S75039) és a zebradánió MT-A szekvenciák (Kille és Olsson 1996, X97278) alapján terveztük. A CMT6 és CMT61 primerek specifikusak az általunk azonosított MT-1, míg a CMT7 és CMT71 primerek az MT-2 szekvenciákra (Hermesz és mtsi, 2000, AF249875).

CMT3: 5' GCAAGTGCACTAATTGCCAG 3',

CMT4: 5' AAGACGCGAGCACAGACGAAC 3',

CMT5: 5' ATGGATCCTTGCGATTGCGCCA 3',

CMT6: 5' CGAACAGGTTTCACATAGGTGA 3',

CMT7: 5' ACAAGTTCACATTGCTGTAG 3',

CMT61: 5' CGATTTAAGAGATTAAATAGAT 3',

CMT71: 5' AGAGAGATTAAATCGGTTATCATC 3'.

A ponty *hsp90*-specifikus cDNS amplifikálásához használt primereket a *zebrafish hsp90α* és *hsp90β* szekvenciái alapján terveztünk (Lele és mtsi, 1998, AF068773 és AF088772).

hsp90-A: 5' GACAAGATCAGATATGAGAG 3'

hsp90-B: 5' TCCATGAAGGCTTTGGTGCC 3'

hsp90-C: 5' GATCGGCTTGGTCTTATTCAGCTC 3'

Ponty *hsp90α* (hsp90-D és hsp90-E) és *hsp90β* (hsp90-F és hsp90-G) specifikus primereket az általunk meghatározott szekvenciák alapján terveztük (Hermesz és mtsi, 2000, AF170295, AF170296).

hsp90-D: 5' ACCCGAGCAAGCTGGACTCT 3',

hsp90-E: 5' CGAAATCATTCCCAACAAA 3'

hsp90-F: 5' ATCCCACCAAACCTGGACAGC 3',

hsp90-G: 5' CGAGATCATCCCCAACGTT 3'.

A PCR reakciókban az MT és *hsp90* mRNS szintet a ponty β-aktin mRNS mennyiségére normalizáltuk. A β-aktin primereket az M24113 szekvencia alapján terveztük.

β-aktin-3: 5' GCAAGAGAGGTATCCTGACC 3',

β-aktin-4: 5' CCCTCGTAGATGGGCACAGT 3'

### ***Genomiális DNS preparálás***

A DNS preparáláshoz máj szövetmintát használtunk fel és a Zhou és mtsi. (1999) által közölt protokollt követtük. 100 µg szövetet 1 ml pufferben (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl, 100 µg Proteinase K) inkubáltunk 55°C-on egy éjszakán át. A mintákat erőteljes szuszpendálást követően centrifugáltuk, és a felülúszóból 0.75 térfogatnyi izopropanollal precipitáltuk a DNS-t.

A csapadékot 70 %-os etilalkohollal mostuk, feloldottuk TE pufferben (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) és 20 µg/ml RNáz A enzimmel kezeltük.

### ***Gélelektóforézis, fragment izolálás***

A PCR termékeket a fragment méretétől függően 0.7-2 %-os agaróz gélen, 0.1 µg/ml ethidium bromid jelenlétében, TAE puffert használva (40 mM Tris-acetát, 10 mM EDTA pH 7.5), frakcionáltuk. Klónozáshoz, szekvenáláshoz a DNS fragmenteket gélből izoláltuk. A DNS-t tartalmazó gélseleteket egy 0.45 µm pórusméretű szűrőt tartalmazó eppendorf csőben (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Unit, Millipore) -20°C-on fagyasztottuk, mechanikailag roncsoltuk majd centrifugáltuk. A vizes oldatból a DNS-t 1/20 térfogat Na-acetát és 2.5 térfogat hideg 96 %-os etilalkohollal precipitáltuk, egy éjszakán át -20°C-on. A centrifugálást követően a csapadékot 70 %-os etilalkohollal mostuk. A DNS-t steril desztillált vízben oldottuk fel és a koncentrációját vagy az  $A_{260} = 50$  µg/ml DNS összefüggést használva határoztuk meg, vagy pedig agaróz gélen ismert mennyiségű DNS-hez viszonyítva becsültük meg.

### ***Ligálás, transzformálás, plazmid DNS preparálás***

Az izolált PCR termékeket pGEM-T Easy vektorba inzertáltuk. A ligáláshoz és a transzformáláshoz a pGEM-T Easy kit-et (Promega) használtuk fel. A ligálási reakció egy éjszakán át 4°C-on ment, az inzert:vektor arány 3:1 volt. A transzformáláshoz a gyártó által ajánlott receptet követtük.

A különböző restrikciós emésztésekből származó genomiális DNS fragmenteket a megfelelően emésztett pBC SK vektorhoz (Stratagene) ligáltuk, egy éjszakán át 14°C-on. A reakcióhoz a Roche *Rapid DNS Ligation* kit-et használtuk.



A plazmid DNS-ek preparálásához a QIAGEN *Plasmid Mini purification* kit-et használtuk a gyártó ajánlása szerint.

#### ***Kadmium és cink tartalom meghatározása ponty szövetmintákban***

A szárított,  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  roncsolt szövet mintákat homogenizálást követően Hitachi Z8200 Zeeman polarizált atomabszorpciós spektrofotométerrel analizálták (SzBK, Növényi Biokémia), koncentrációtól függően acetilén-levegő láng, vagy grafitkályhás (elektrotermikus) atomizálással. A Cd tartalmat  $\mu\text{g}/\text{szárazsúlyban}$  adtuk meg.

#### ***Géldokumentáció, denzitometráls***

Az ethidium bromiddal festett géleket, és az autoradiogramokat egy GDS 7500 típusú gél dokumentációs rendszeren analizáltuk, a *GelBase/GelBlot<sup>TM</sup> Pro Gel analysis* szoftvert felhasználásával.

## EREDMÉNYEK

### A metallothionein és *hsp90* gének azonosításának stratégiája

A fenti gén családok egy vagy több tagjának pontyból történő azonosításához az RT-PCR módszert használtuk. A sikeres amplifikálás érdekében a kiindulási templatként szolgáló mRNS-t több szövetből is preparáltuk, mind indukátlan, mind pedig indukált körülmények között. Ezzel reméltük biztosítani azt, hogy a két gén család tagjai - feltételezve, hogy más fajokhoz hasonlóan a pontyban sem csak egyetlen tagjuk van - reprezentálva lesznek az mRNS populációban, még akkor is, ha azok markánsan különböznek alapexpressziójuk és indukálhatóságuk tekintetében, illetve nagyon eltérő szövetspecifikus expresszióval rendelkeznek. A cDNS-ről való amplifikáláshoz használt primerek kiválasztása a következő megfontolás alapján történt. A primerek pozícióját úgy választottuk meg, hogy az azok által amplifikált szakasz tartalmazzon az adott gén család tagjait elkülönítő jellegzetes motívumokat, lehetőséget biztosítva ezzel arra, hogy az amplifikált szekvenciák, amennyiben nem homogének, egymástól megkülönböztethetők és besorolhatók legyenek. A primerek konkrét pozíciójához természetesen olyan evolúciósan konzervált régiókat választottunk, melyek a munka ezen fázisában, az adatbázisokban rendelkezésre álló szekvenciák összehasonlításával azonosíthatók voltak. A primereket az evolúciósan legközelebb álló fajok fenti régióinak szekvenciája alapján terveztük meg, feltételezve azt, hogy azok az evolúciós skálán közeli pontyból izolált templaton is produktív amplifikálást eredményeznek majd. Számítva azonban arra, hogy a ponty homológ szekvenciái - a konzerváltság ellenére - egy vagy több ponton eltérhetnek az ismert szekvenciáktól, az amplifikálás első néhány ciklusában alacsony hibridizálási hőmérsékletet alkalmaztunk, lehetőséget biztosítva ezzel a specifikus amplifikálásra nem tökéletesen komplementer templat esetén is.

## 1. Metallothionein gének izolálása és expressziójának vizsgálata

### *Metallothionein specifikus cDNS-ek amplifikálása pontyból*

Kito és munkatársai már 1986-ban azonosítottak két, aminosav összetételében rendkívül hasonló de mégis karakterisztikus különbségeket mutató ponty metallothionein fehérjét, a MT-I-et és az MT-II-öt. A fehérjét kódoló génekről az irodalomban nem jelent meg leírás, de 1997-ben elhelyezték a MT-I gén genomiális és cDNS szekvenciáját a GenBank-ban (AF001983, AF002161). Ezen felül a pontyfélék családjából további két faj (*Danio rerio*, MT-A; és *Carassius auratus*, MT) egy-egy metallothionein génjének ismertük a teljes kódoló szekvenciáját (183 bp), illetve mindkét esetben egy-egy rövidebb 3' NTR szakaszt (126 ill. 129 bp). Ahogy már a bevezetőben említettük a magasabb rendű gerinceseknél az MT gének több családba sorolhatóak és egy családon belül is több variáns különböztethető meg. A három halfajból leírt cDNS szekvenciák elemzése érdekes különbséget tárt fel a 3' NTR régióban: a zebradánio (*Danio rerio*) és az aranyhal (*Carassius auratus*) között csak egyetlen rövid, három nukleotidos szakaszon találtunk eltérést, míg a ponty-szekvenciával történő összehasonlítás ennél lényegesen nagyobb különbséget mutatott ki (16 és 18 nukleotid eltérés, valamint egy 5, 3, 2 és két 1 bp-os *gap*, 5. ábra). Feltételeztük, hogy a fenti különbség nem a fajok közti távolságot tükrözi, hanem a különböző osztályba tartozó MT génekre utal. Ezért a 3' végi primert erre a régióra terveztük úgy, hogy a legnagyobb homológiát mutassa mind a három ismert MT szekvenciához, de az amplifikált DNS szakasz hordozzon jellegzetes megkülönböztető jegyeket, különös tekintettel a méretbeli különbségre. Az 5' végi primer szekvenciák kiválasztásánál - a kódoló régiók nagyfokú hasonlósága miatt - nem volt sok választási lehetőségünk, ezért azt közvetlenül a kódoló régió elejére terveztük. Egy második 5'

primert is terveztünk azért, hogy segítségével meg tudjunk győződni az első PCR reakcióban amplifikált termék specifikus voltáról.

		CMT5		CMT3
<i>Cyprinus c.</i>	1	<u>ATGGATCCTTGCGATTGCGCCAAGACTGGAAGCTGCAATTGTGGTGCCACCTGCAAGTGC</u>		
<i>Carassius a.</i>	1	.....G.....A.....G.....C.....		
<i>Danio r.</i>	1	.....A.....G.....C.....		
<i>Cyprinus c.</i>	61	<u>ACTAATTGCCAGTGTA</u> AAACATGCAAGAAGAGCTGCTGCCCGCTGCTGCCCGTCTGGATGC		
<i>Carassius a.</i>	61	..C.....C...C.....T.....TT.....T...		
<i>Danio r.</i>	61	..C.....C...C.....T.....TT.T..T.....T...		
<i>Cyprinus c.</i>	121	AGCAAGTGC		
<i>Carassius a.</i>	121	.....C..G..T.....A		
<i>Danio r.</i>	121	.....T.....GA.....A		
				CMT4
<i>Cyprinus c.</i>	181	TGAGGAGGTCAACGTG-TGTTTTGTTACAACCTCACCTATGTGAACCTG	<u>TTTCGTCTGTGCT</u>	
<i>Carassius a.</i>	181	.....A.....A-----.....T.....		
<i>Danio r.</i>	181	.....A.....A-----.....T.....		
<i>Cyprinus c.</i>	241	<u>CG-CGTCTTCGTTT</u> TGTCATCGCATGAATGTAGTCTTTTACAAGAT--AATAAATGGC		
<i>Carassius a.</i>	236	G G.....GCG....C.....TT.A.....T...TCT.....C.A.		
<i>Danio r.</i>	236	G.G.....C....C.....TT.A.....T...TCT.....C.A.		
<i>Cyprinus c.</i>	297	CTCTAGTTCTCAAATCTGA	315	
<i>Carassius a.</i>	296	...C--C.G.T.....C.	312	
<i>Danio r.</i>	296	...C--C.G.T.....C.	312	

**5. ábra:** *Cyprinus carpio* (ponty), *Carassius auratus* (aranyhal) és *Danio rerio* (zebradánió) MT szekvenciák összehasonlítása. Az utóbbi kettőben csak a ponty szekvenciájától való eltérést tüntettük fel. A vastagon szedett betűk a kódoló régiót jelzik. Az amplifikáláshoz használt primerek pozícióját aláhúzással jelöltük.

Az amplifikáláshoz szükséges RNS-t májból, veséből és agyból izoláltuk. Mivel az alapexpressziója még az ismert MT-I génnek sem volt ismert a különböző

szövetekben, az RNS-t nem csak kezeletlen állatokból, hanem az egy napig 10 mg/l Cd hatásának kitett halakból származó mintákból is izoláltuk.

Az RT-PCR amplifikáláshoz a CMT5/CMT4 oligonukleotid párt használtuk fel. A különböző eredetű cDNS templátokon végzett reakcióban egyetlen, azonos méretű terméket amplifikáltunk. Az ampikonok hossza a várt mérettartományba esett, és melléktermékek nem voltak kimutathatóak. Bár ez az eredmény nagyon biztató volt, valamennyi esetben termékanalízist csináltunk, azaz az első reakció termékét templátként használva elvégeztünk egy *semi-nested* amplifikálást is a CMT3/CMT4 primer párral. Ezekben a reakciókban is egyetlen, a várt méretű terméket kaptuk. Ezek után már elég nagy volt a valószínűsége annak, hogy primereinkkel specifikusan ponty metallothionein szekvenciát amplifikáltunk, arról azonban semmilyen információnk nem volt még, hogy a termékpopuláció egyetlen génről amplifikálódott-e, vagy több MT gént reprezentál.

Ennek eldöntésére a kezeletlen máj, vese és agymintákból származó termékeket izoláltuk agaróz gélből és meghatároztuk a szekvenciájukat. A három szövetmintát reprezentáló szekvenciák nagyon hasonló „mintázatot” mutattak; a tisztán, jól olvasható szekvencia részleteket néhány pozícióban nehezen olvasható, „zavaros” szakaszok választották el egymástól. Ez különösen a 3' végi nem transzlálódó régiót jellemezte. Ez a jellegzetesség arra utalt, hogy több mint egy, egymáshoz nagyon hasonló MT génről történt amplifikálás. A három szövet képviselő szekvenciákat összehasonlítva leginkább az agyból származó minta tűnt heterogénnek. Ezért ezt a PCR terméket klónoztuk, majd meghatároztuk hét független rekombináns plazmidban található inzert nukleotid sorrendjét. A szekvenciákat egyértelműen két csoportba lehetett osztani: az egyikbe tartoztak azok, melyek egyetlen nukleotid kivételével (a 129. pozícióban egy C/T csere) megegyeztek a már ismert MT-I szekvenciával. Ez az egy eltérés nem

vezetett aminosav cseréhez. A második csoportba sorolt szekvenciák a kódoló régióban 12 pozícióban tértek el az MT-I nukleotid sorrendjétől, melyek közül kettő aminosav cserét is eredményezett. A két csere egyike egy Lys/Thr szubsztitúció a 26. pozícióban, ami karakterisztikus az MT-II izoformákra (Bargelloni és mtsi, 1999). A 3' végi nem kódoló szakaszon az MT-I-hez képest további öt nukleotid cserét és két, 3 illetve 5 bp-os *gap*-et találtunk (6. ábra).

MT-1	M D P C D C A K T G T C N C G A T C K C	20
MT-1	atggatccttgcgattgcgccaagactggaacttgcaattgtggtgccacctgcaagtgc	60
MT-2	.....C.....	60
MT-2	. . . . .	20
MT-1	T N C Q C K T C K K S C C P C C P S G C	40
MT-1	actaattgccagtgtaaaacatgcaagaagagctgctgcccctgctgcccgctctggatgc	120
MT-2	....C.....C...C.....t.....tt....t.....t... 120	
MT-2	. . . . . T . . . . . S . . . . .	40
MT-1	S K C A S G C V C K G N S C G S S C C Q	60
MT-1	agcaagtgcgcctctggctgcgtgtgtaagggcaactcctgcggctccagctgctgtcag	180
MT-2	.....t.....t.....a	180
MT-2	. . . . .	60
	^ ^ ^	
	CMT6	
MT-1	tgaggaggtcaacgtgatgttttgttacaactcacctatgtgaacctgttcgctctgtgct	240
MT-2	...--.....C....C.....g.a.....t..... 232	
	^ ^ ^	
	CMT7	
MT-1	cgcgtcctt	248
MT-2	.....	240

**6. ábra:** A pontyból izolált két metallothionein cDNS és az általuk kódolt fehérjék összehasonlítása. Referenciaként az MT-1 szekvenciát tüntettük fel, az MT-2 szekvenciákban csak az eltéréseket jelöltük. Az izoforma specifikus primerek pozícióit aláhúzva mutatjuk.



A szekvencia hasonlóságokat és különbségeket összevetve úgy gondoljuk, hogy az első csoportba tartozó gén (MT-1) azonos a ponty már ismert MT-I génjével, vagy legalábbis azonos családba tartozik vele. A második csoportba tartozó szekvencia viszont egy új ponty MT gént reprezentál, amit MT-2-nek neveztünk el. Ez utóbbi gén nukleinsav szinten 86 %-ban azonos a ponty MT-1, és 91 illetve 93 %-ban az aranyhal és a zebradánió szekvenciákkal.

A két szekvencia 3' végén azonosított eltérés lehetővé tette a CMT6 és CMT7 génspecifikus primerek tervezését (6. ábra). E két új primer specifikitását, a CMT5 és CMT3 5' végi oligonukleotidokkal párban teszteltük, a szekvenált MT-1 és MT-2 templátokon. Mind a két új primer specifikusnak bizonyult az adott génre, az általunk használt reakcióparaméterek mellett a CMT5/3-CMT6 kombinációban csak az MT-1 templátról, a CMT5/3-CMT7 párosításban pedig csak az MT-2 DNS-ről történt amplifikálás. Így lehetőségünk nyílt mindkét gén expressziójának specifikus nyomon követésére.

### ***Ponty metallothionein gének amplifikálása genomiális DNS templátról***

Az ismert MT gének általában rövidek. A cDNS szekvenciák birtokában ezért reményünk volt arra, hogy a teljes MT-1 és MT-2 géneket is izolálni tudjuk a genomról. A strukturgén amplifikálásához a már bizonyítottan MT génekre specifikus CMT5/CMT6, illetve CMT5/CMT7 primer kombinációkat alkalmaztuk, genomiális DNS-t használva templátként. Közel azonos hosszúságú (~ 450 bp) terméket kaptunk mind a két reakcióban, ez megfelelt az MT-I genomiális szekvencia alapján várt értéknek. A DNS fragmenteket agaróz gélből történt izolálásuk után megszekvenáltattuk, szekvenáló primerként az amplifikáláshoz használt oligonukleotidokat használva. A genomiális és a megfelelő cDNS szekvenciákat

összehasonlítva azonosítottuk az exon-intron határokat (7. ábra). Az exonok nukleotid sorrendje 100 %-ban megegyezett a megfelelő cDNS szekvenciákkal. Mind a két MT gén esetében két intron szakítja meg a kódoló régiókat, azonos pozícióban. Az intronok mérete közel azonos, az első intron mindkét esetben 125 bp, a második pedig az MT-1 esetén 77, míg az MT-2-ben 84 bp hosszú, szekvenciájuk azonban jelentős eltérést mutat (7. ábra).

Különbséget találtunk az általunk amplifikált MT-1 és az adatbázisban elhelyezett ponty MT-I genomiális szekvenciák között is. Az első intronok nukleotid sorrendje 9 ponton tér el, valamint mind a kettőben található egy 3 bp-os deléció. Ezen felül az MT-1 génben az első intron 3' végén egy 31 bp-os inzerció történt. A második intronok összehasonlítása során csupán egy négy nukleotidnyi méretbeli különbséget találtunk. Érdekességgént említenénk itt meg, hogy az MT-1 és MT-2 gének összehasonlítása során is a második intron mutatott nagyobb mértékű konzerváltságot.

A strukturgének azonosításán felül szeretnénk volna a promóter régiót tartalmazó genomiális régiókat is amplifikálni. Ehhez a kísérlethez a már meglévő gén-specifikus primerek felül, a két gén második intronjában azonosított szekvencia különbségek alapján két új, az MT-1 illetve MT2 génre specifikus primert terveztünk (CMT61 és CMT71, 7. ábra). A ponty genomiális DNS-t EcoRI, HindIII és EcoRV enzimekkel emésztettük, majd a teljes fragment populációt a hasonlóan emésztett pBC SK plazmid végeihez ligáltuk. A ligálási reakció termékét használtuk a PCR reakcióban templát DNS-ként. Az első PCR reakciókban a CMT6 illetve CMT7 génspecifikus primereket a plazmid T3 és T7 primereivel használtuk párban. Az első reakciók termékét tovább amplifikáltuk egy-egy *semi-nested* reakcióban, melyhez az újonnan tervezett génspecifikus primereket (CMT61 és CMT71) használtuk. Mivel a genomiális DNS fragmentek a ligálás során mind a két orientációba beépülhettek a plazmidba, abban

MT-2 AAGCTTTCAAAAATTGTTTCTCCGCGAACATCTTCTAAAGATGCCCTCGACAGGCCTGTGTCTG

MT-2 CTTAAATGATAACTTGCTGATGCTCAAATACATGCTTATTTTAATATTTAAAAGGGTAGTAGCC

MT-2 TAGCACTTTGCTTTTTTACAACTAAAGCCATTAAAGAAGCTCAGAACTGAGCAAGTATGACA

MT-2 AAGTATGGTCTTTTATAGTTCTCCTTGATTCTAACAAAATACTTTATGCTATTAAAAACAAGAT

MT-2 CTTTCACCTCCCCCTCCCAAAAAAAAAACATAAAAAAGCTTCGAATTATTTAATCACATAAACAC

MT-1 -----GAATTCTCTAATCACATAAACGT

\*

MT-2 TGCGCAATCAATATTCAGCCAGTCGAAAGGAAATGGTAGTTATATAATCGTATAAATAACCCAT

MT-1 TTCGCAATCAATATTCAGCCCGCCGAGTGGAATGATAGTTATATAATAGTGTAACCAACAT

MT-2 TGATGTGA--CAGGGTGGGAATGGTGATTCTGATTGTTTGATTGAGTTTGCACCCAGTT

MT-1 TGATGTGAATCAGGGTGGGATTGGAGATTCC-----TTTGAT-----AGTTTGCACCCGGTG

MT-2 TCATTAACGAGTCACCGTGTGTCAGGCTGGAGCGGGCGGGCTTTTGCACCTCGGTCTGTGTGCAGT

MT-1 TCATTAATGAGTCACCGTGTGCGGGCGGGAG---CGGGCTTTTGCCCTCGGGCTGTGTGCAGT

\*

MT-2 CTGAGCTGTATATAACCAGCGCCCG-ATCACTGTCTGGTACCTTCCACATCAAGTCATTCACG

MT-1 CAGGGCTGTATAAACAGGGGCAGGATCAGTCTCTGGTATCTTCCCCATCAAG-CATTCACA

MT-2 AACTGAGTGAAGTGAGATTTCTG-AGGGACTTTTCGGGCTCTTTAAGGATACTCTTGAGGAAAA

MT-1 AATCGAGTGAAGCGAGACTTTTTAAGGGACTTC-----GGA--CTCTTGAGGAAA-

MT-2 **ATGGATCCTTGCGATTGCGCCAAGA**gtaagtgtttcaaattgttcagtgagtttacatttttaa

MT-1 **ATGGATCCTTGCGATTGCGCCAAGA**gtaagtgttttatatgctgattttacagtaatatgagat

MT-2 gagtgtcttaaaaatgcagttactttatatactttcaccagtatgtcaacaacatacaacctcta

MT-1 ttagtttttgtactaggaatccagtcacttatagaagtgtcaatgtcaccaccagggaattgt

MT-2 atttttttatttatttattttaa**GCTGGA**ACTTGCAACTGTGGTGCCACCTGCAAGTGCACTAAC

MT-1 aacgttggttttttcttttgta**GCTGGA**ACTTGCAATTGTGGTGCCACCTGCAAGTGCACTAAT

MT-2 **TGCCATTGTACAACCTGCAAGAAGA**gttcgtgaactataacaaccagtgattgatgataaccga

MT-1 **TGCCAGTGTA**AAACATGCAAGAAGAgtagcgtaaaccattacatcctaataatct-----a

CMT71

MT-2 tttaaatctctctaaaaatctagtggctaaatc-tgtgt-tctcgcag**GTTGCTGTTCCTGTTGC**

MT-1 tttaaatctct-taaa--tcgggcgactaactattgtctctcacacag**GCTGCTGCCCCTGCTGC**

CMT61

MT-2 CCGTCTGGTTGCAGCAAGTGTGCCTCTGGCTGCGTGTGTAAGGGCAATTCCTGCGGCTCCAGCT

MT-1 CCGTCTGGATGCAGCAAGTGCGCCTCTGGCTGCGTGTGTAAGGGCAACTCCTGCGGCTCCAGCT

MT-2 **GCTGTCAATGA**---GGTCAACGTGATGCTTTGCTA-----CAGCAATGTGAACCTTGT

MT-1 **GCTGTCAATGA**AGGAGGTCAACGTGATGTTTTGTTACAACCTCACCTATGTGAACCTGTTGC

**7. ábra:** A ponty MT-1 és MT-2 genomiális szekvenciák összehasonlítása. A fehérjéket kódoló szekvenciákat vastag szedéssel, az intronokat kisbetűkkel tüntettük fel. A feltételezett promóter szekvenciákat piros, az MRE konszenzus szekvenciákat kék, a Cpl1-kötő szekvenciákat pedig lila színnel jelöltük. Az Spl kötő szekvenciát egyszeres, a genomból történő amplifikáláshoz használt restrikciós helyeket pedig dupla aláhúzás jelzi. Az MRE motívumokban a konszenzustól eltérő nukleotidokat csillag mutatja. Az amplifikáláshoz használt intronspecifikus primerek pozícióját hullámos aláhúzás jelzi.



bízunk, hogy sikeres amplifikáció esetén a génspecifikus primerek közel azonos, de számíthatóan eltérő méretű szakaszt fognak amplifikálni a két plazmid specifikus primerrel. Az MT-1 gén esetében, az EcoRI emésztést használva több különböző méretű amplikon mellett mind a két reakcióban kaptunk egy kb. 650 bp hosszú terméket. A T7/CMT6 reakciónak ezt a termékét gélből izoláltuk, és egy újabb *semi-nested* reakcióban (a vektor és génspecifikus KS/CMT61 *nested* primerpárt használva) igazoltuk specifikus voltát, majd meghatároztuk a szekvenciáját. Az újonnan amplifikált szakasz átfedett a már korábban izolált MT-1 genomiális DNS régióval, az ATG kodontól 5' irányba további 310 bp-t tartalmazott.

Az MT-2 gén esetében a HindIII emésztés használata vezetett eredményre. A fentiekhez hasonló kísérletsorozatban egy 1000 bp körüli amplikont izoláltunk. A szekvenálást az amplifikáláshoz használt primerekkel illetve a már meghatározott szekvencia alapján tervezett specifikus primerekkel végeztük el. A szekvencia ebben az esetben is átfedett a már ismert MT-2 genomiális régiókkal, és a kódoló régiótól 5' irányban további 635 bp szekvencia vált ismertté.

Az MT-1 gén esetén az átfedő terület 100 % egyezést mutatott, míg az MT-2 esetén az átfedő 302 nt hosszúságú szakaszon 2 bp eltérést találtunk. Ez az eredmény erősen valószínűsíti, hogy valóban az MT-1 és MT-2 cDNS-eket kódoló géneket sikerült azonosítanunk. Az MT-2 esetén talált két eltérés esetleg betudható az extenzív amplifikáció során keletkezett, polimeráz által generált mutációnak, vagy pedig a cDNS által azonosított gén egy alléljára utalhat.

#### ***Az MT gének promóter régióinak összehasonlítása és elemzése***

A transzlációs start ponttól 5' irányban az MT-1 génből 310, az MT-2 génből pedig 635 bp szekvenciát azonosítottunk. Az MT-1 gén ezen a szakaszon 98%-os homológiát mutat az MT-I szekvenciával. Az MT-2 promóter régiót újonnan

azonosítottuk, így csak a két paralóg szekvencia összehasonlítására nyílt lehetőség (7. ábra). A két szekvencia néhány *gap* bevezetésével egyértelműen egymás alá rendezhető, így a közös evolúciós eredet nyilvánvaló, de a *gap*-eken felüli 34 nt eltérés mutatja a jelentős divergenciát is.

A szekvenciák komputeres analízisének eredménye (*PromoterScan/SignalScan at NIH*) azt mutatja, hogy a transzlációs start ponttól közel azonos távolságban (98 bp és 111 bp) mindkét promóter régióban találunk TATA *boxra* jellemző konszenzus szekvenciákat. Ettől 10 bp távolságra 5' irányban mindkét promóterben megtalálható egy tökéletes MRF-kötő konszenzus szekvencia (TGCPuCNC), a konvencionális felíráshoz képest fordított orientációban. Az MT-2 promóterben ezen felül három további tökéletes, és egy, a konszenzustól 1 nt eltérést tartalmazó MRE motívumot találtunk. Az MT-1 promóter régióban további két, egy *mismatch*-et hordozó MRE szekvenciát sikerült azonosítani.

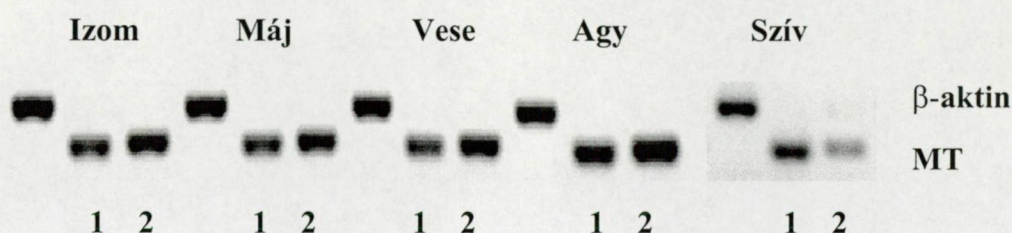
A fém-reszponzív elemeken felül mindkét promóterben egy-egy, az ismert Sp1 és Cpl transzkripció faktorok által felismert motívumot is azonosítottunk a TATA *box*-hoz közel (7. ábra).

### ***Az MT gének szövetspecifikus alapexpressziója***

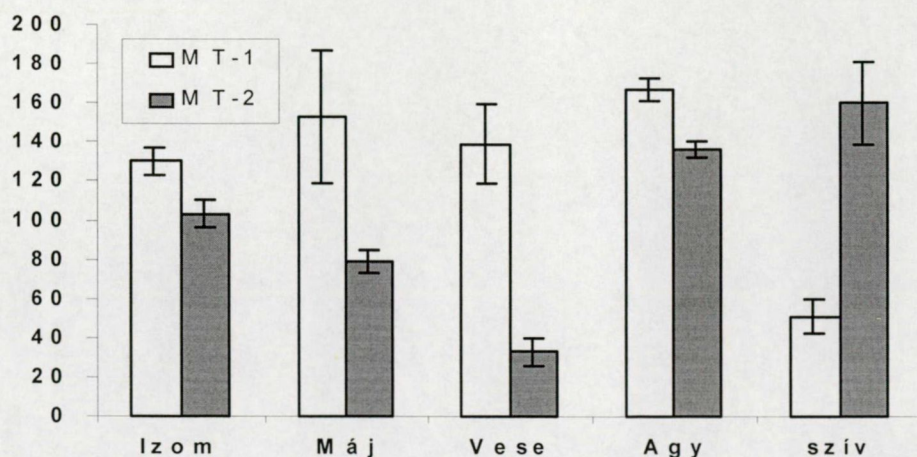
Emlősejtekben az MT gének szövetspecifikus expressziót mutatnak. Halakban az MT mRNS alapszintekre nézve kevés a publikált információ, az MT-ek egymáshoz viszonyított aránya pedig szinte teljesen ismeretlen a különböző szövetekben. Az MT-1 és MT-2 expresszióját félkvantitatív RT-PCR reakciókban követtük, ahol a génspecifikus primerek biztosították az amplifikálás specifitását. Az adott MT mRNS mennyiségét egy belső kontrollhoz, a  $\beta$ -aktin mRNS szintjéhez viszonyítva állapítottuk meg. Az alap expressziókat kezeletlen halak máj, vese, agy, izom és szív szöveteiben vizsgáltuk.

A legmagasabb össz-MT mRNS (MT-1 + MT-2) szintet az agyban mértük, ezt követte az izom és a máj, majd a szív és a vese. Ezen belül a kétféle MT megoszlása nagy variabilitást mutatott a vizsgált szövetekben. Az agyban, izomban, májban és vesében közel azonos szintű MT-1 expressziót kaptunk. Az MT-2 mRNS mennyisége egyik fent említett szövetben sem haladta meg az MT-1-ét. A legmarkánsabb különbség a vesében volt mérhető, itt az MT-1/MT-2 arány 4.5 körüli érték volt, míg az agyban és az izomban alig haladta meg az egyet (1.1-1.2). Az ötödik szövetmintában, a szívben az MT-1/MT-2 arányra egynél kisebb érték kaptunk, itt az MT-2 mRNS mennyisége közel háromszorosa volt az MT-1-nek (8. ábra).

**A**



**B**



**8. ábra:** Az MT-1 és MT-2 specifikus mRNS-ek relatív mennyiségének megoszlása a különböző szervekben, indukátlan állapotban. **A:** reprezentatív PCR amplifikálás. **B:** Az amplifikálások kvantitatív kiértékelése. Minden egyes szövetben 6-8 egyedből végeztük el a mérést, minden amplifikálást háromszor megismételve. A kétféle MT mRNS szint minden szervben szignifikánsan különbözött ( $P < 0.05$ ).

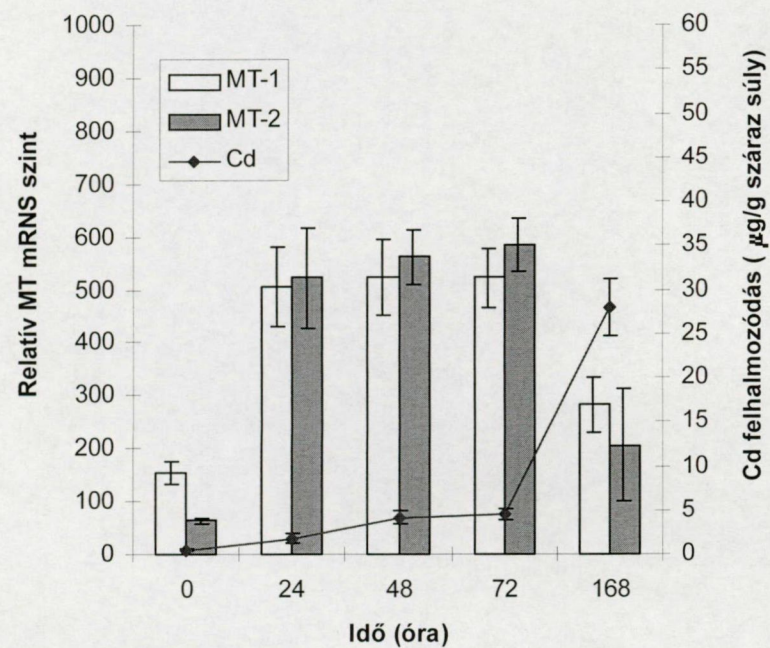
Kísérleteink többségét megismételtük különböző évszakokban. A fent említett eredmények két egymást követő télen végzett kísérletek összegzéséből származtak. Összehasonlítottuk ezeket az értékeket egy kora nyári sorozat eredményeivel, hogy lássuk előfordulnak-e szezonális különbségek. A május-június a ponty esetében már az ivási időszak végét, illetve az azutáni állapotot jelenti, amikor esetleg jelentős hormonális változások befolyásolhatták a gének expresszióját. Szignifikáns szezonális ingadozást egyetlen egy szervben mértünk: a májban sok esetben oly mértékben megnőtt az MT-2 mRNS szint, hogy itt - hasonlóan a szívhez - az MT-1/MT-2 hányados egynél kisebb értéknek adódott. Átlagban egy 2-2.5-szeres MT-2 mRNS szint emelkedés volt a jellemző, de ez igen erős egyedi ingadozást takar, voltak egyedek, ahol a téli átlaggal egyezett meg mind a két MT alapszint.

#### ***Kadmium hatása a MT gének expressziójára májban, vesében és agyban***

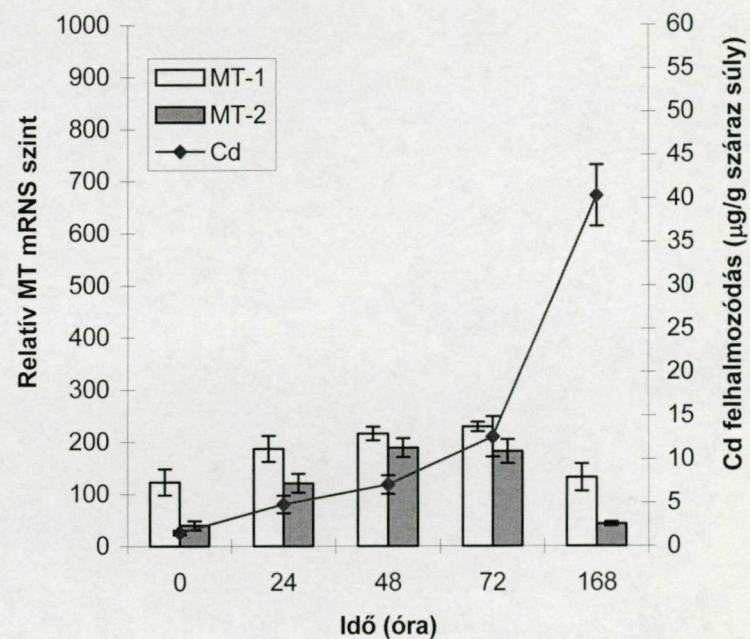
Az MT-ek egyik fontos feladata a kadmium, mint az egyik legveszélyesebb nehézfém detoxifikálása. A kadmium expozíció hatását a két MT gén kifejeződésére májban, vesében és agyban vizsgáltuk. Májban a kadmium 1 mg/l koncentrációban különböző mértékben befolyásolta azok expresszióját (9. ábra). Az MT-1 mRNS mennyisége 3-3.5-szeresére növekedett a 24 órás expozíciót követően, míg az MT-2 gén indukciója jóval nagyobb volt, 8.5-szeres növekedést mértünk. Így az MT transzkriptumok mennyisége - az eltérő alapszintek miatt - közel azonos értéket ért el ebben az időpontban. A 24-ik órában már maximális indukciót mértünk, az elkövetkező két napban nem változott jelentősen egyik MT mRNS mennyisége sem. A következő mintavétel a kezelés hetedik napján történt, ekkor már az indukciós görbe leszálló ágában kaptunk értékeket, az MT-1 mRNS szint másfélszerese, az MT-2 pedig háromszorosa volt az alapértéknek.



A



B

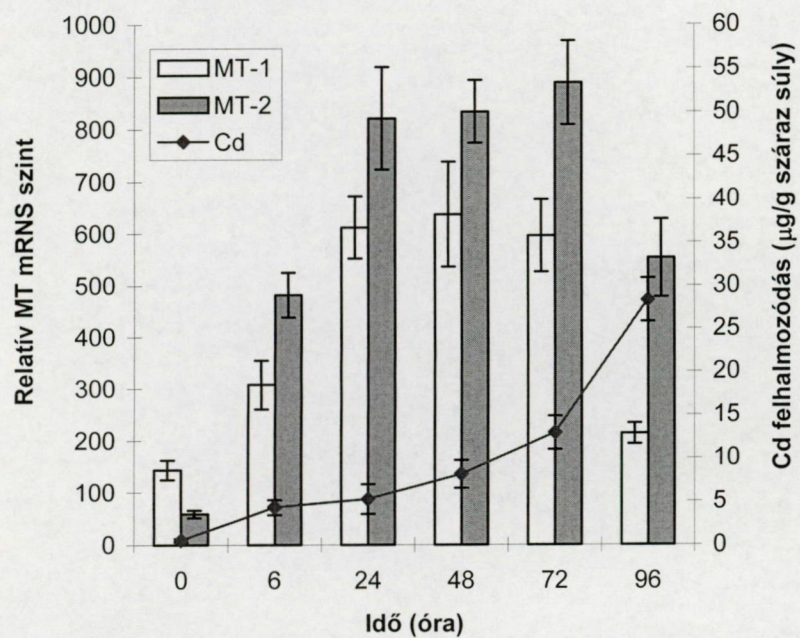
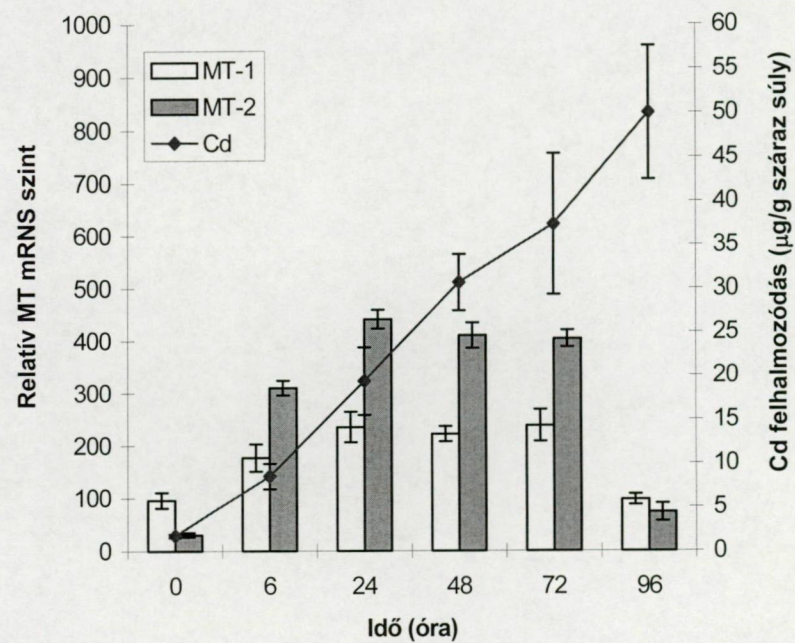


**9. ábra:** Az MT-1 és MT-2 gének indukciójának kinetikája 1 mg/l Cd kezelés hatására májban (A) és vesében (B). A Cd akkumulációját a két szervben a folyamatos vonal jelzi. Az adatok 3-4 egyeden történt mérések átlagai.

A vesében a kadmium 1 mg/l koncentrációban gyenge indukáló szernek bizonyult, az indukció kinetikája ugyan hasonló volt a májban tapasztaltakhoz, azonban az MT mRNS alapszintek, és a gének indukciójának a mértéke is jóval alacsonyabb volt (9. ábra). Az MT-1 mRNS mennyisége 24-72 óra között másfélszerese volt az alapértéknek, majd a 168-ik órára a kontroll érték körüli szintre esett vissza. Az MT-2 gén esetében talán még markánsabban látszik az MT-ekre jellemző szövet specifikus expresszió. Az MT-2 mRNS alapszintje kevesebb mint fele a májban mért értéknek. A maximális indukció mértéke sem érte el a májra jellemző szintet, vesében 3.5-4-szeres növekedést mértünk csak, a májban megfigyelt 8.5-szörös indukcióval szemben. Az MT-1 transzkriptum mennyisége minden mérési pontban magasabb volt, mint az MT-2-é, annak ellenére, hogy a két gén közül az MT-2 indukciója közel 2.5-szerese volt az MT-1-ének.

A kadmium tízszer magasabb dózisban (10 mg/l) alkalmazva sem bizonyult letálisnak a 96 órás inkubálás alatt. Hasonlóan az előző kísérletsorozathoz, az MT gének tranziens indukciót mutattak, a maximális MT mRNS szintet 24 és 72 óra között mértük mind a két szervben (10. ábra). Lényeges különbség mutatkozott azonban az indukció mértékében a kétféle MT gén között. Az MT-1 mRNS mennyisége, a tízszer magasabb koncentrációjú Cd hatására 4.5-4.8-szorosára emelkedett a májban, ami csupán 1.3-szoros növekedést jelent az alacsonyabb kadmium koncentrációval elért indukcióhoz képest. Az MT-2 gén indukciója ennél jóval hatékonyabb volt; 6 óra elteltével már 8-szorosára nőtt az MT-2 mRNS mennyisége és további dinamikus növekedés jellemezte a változást. A kezelés 24-72-ik órájában 14-15-szörös volt az emelkedés, és az utolsó, 96 órás mintavételkor még mindig az alapszint 9-szerese volt az MT-2 mRNS mennyisége.



**A****B**

**10. ábra:** Az MT-1 és MT-2 gének indukciójának kinetikája 10 mg/l Cd kezelés hatására májban (A) és vesében (B). Az adatok 3-4 egyeden történt mérések átlagai.

Vesében az MT-1 mRNS mennyiségének maximális emelkedése 2.2-2.4-szeres volt az alapszinthez viszonyítva. Az MT-2 gén viszont oly mértékű indukálhatóságot mutatott a nagyobb dózisban használt kadmium kezelés hatására, amit még a májban sem tapasztaltunk. Hat órás fém expozíció után már 12.5-szeres növekedést mértünk, majd az indukciós maximumban 17-18-szoros volt az emelkedés. A kísérlet utolsó napjára az alaphoz közeli értékre esett vissza az MT-1 mRNS szint, és a 96 órás expozíció az MT-2 esetében is csak kétszeres indukciót eredményezett (10. ábra).

Agyban, sem az 1 mg/l sem pedig 10 mg/l kadmium kezelést követően nem mérünk változást egyik MT mRNS mennyiségében sem.

#### ***Kadmium akkumulációja májban, vesében és agyban***

Az MT mRNS szint változás követésével párhuzamosan mind a három szövetmintából megtörtént a kadmium felhalmozódás mérése is, minden kísérleti időpontban. Kezeletlen halak májában és az agyában a kadmium jóval kisebb mennyiségben volt jelen mint a vesében. Agyban a kezelés során nem volt mérhető kadmium felhalmozódás, valószínűleg a vér-agy gát működése miatt. A májban és a vesében a kadmium akkumuláció jó összefüggést mutatott a kezelés időtartamával valamint a kezelésben használt fém koncentrációval. A vesének a kísérletek során végig magasabb volt a kadmium tartalma, egy 2-4-szeres különbség jelentkezett a májban mért értékekkel szemben. A fém felhalmozódás ütemét összehasonlítva azonban májban volt gyorsabb az akkumuláció (9. és 10. ábra).

#### ***Réz hatása az MT gének expressziójára májban, vesében és agyban***

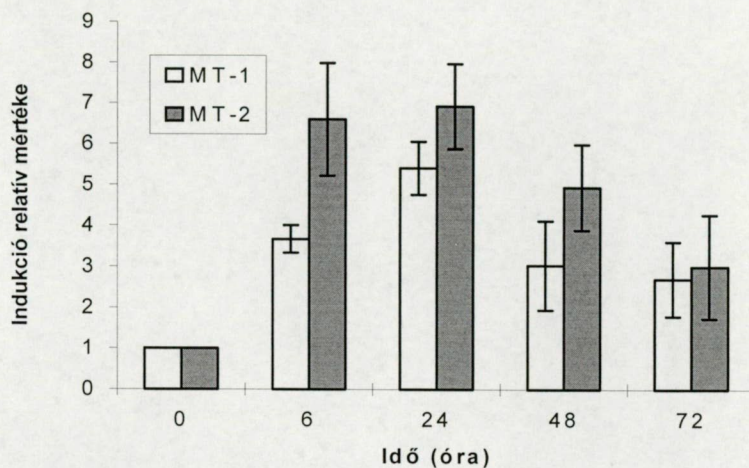
Bár a rezet esszenciális fémként tartjuk számon, nagy mennyiségben toxikussá válik a szervezet számára. Halakra kifejtett hatását a kadmiumhoz hasonlóan két koncentrációban vizsgáltuk. 1 mg/l koncentrációban nem bizonyult a ponty MT gének

hatásos indukáló szerének. Ennél a koncentrációnál vesében a 96 órás inkubációs idő alatt nem történt szignifikáns változás egyik MT mRNA mennyiségében sem. Az MT-1 gén a májban sem indukálódott, az MT-2 mRNA mennyisége 48 óra elteltével másfélszeresére emelkedett. Emelve a réz koncentrációt 10 mg/l-re, mind a két gén expressziójában változás történt (11. ábra). Az indukció függetlenül attól, hogy melyik szövetet vizsgáltuk, tranziens volt. Hasonlóan a kadmium kezelésnél tapasztaltakhoz az MT-2 gén volt az, melynek az expressziója a májban és a vesében is jelentősen változott. Májban a hat órás fém expozíció már maximális indukciót eredményezett: 6-7-szeresére nőtt az MT-2 mRNA mennyisége és ezt az értéket detektáltunk még 24 óra elteltével is. A 48 órás mintában már valamivel alacsonyabb volt az MT-2 mRNA szint, a kontroll értéknek már csak 5-szörösét mértünk és további csökkenést tapasztaltunk a 72 órás mintában, ahol az indukció mértéke 3-szoros volt. Az MT-1 gén expressziója valamivel kisebb mértékben változott: 6 óra elteltével 3.5-szeresére nőtt meg az MT-1 mRNA szint, majd 24 órára elérte a maximumot, 5.5-ször nagyobb értéken, mint az alapszint. A következő két napon a mért MT-1 mRNA mennyisége még mindig magas, 3-3.5-szeres volt. A kadmium kezelésnél tapasztaltakkal ellentétben, ebben a kísérletsorozatban a két MT gén indukciója között mindössze 1.5-2-szeres különbséget mértünk az MT-2 javára, ezért az MT-1 mRNA mennyisége a mérés minden pontján meghaladta az MT-2 mRNA szintjét. Vesében kinetikájában hasonló, de a mértékét tekintve jóval kisebb változást mértünk, az indukció a májban kapott értékeknek körülbelül a fele volt (11. ábra). Maximum indukciót mind a két génre nézve a 24 órás Cu expozícióval értünk el. Ekkor 3-szoros MT-1 és 4-szeres MT-2 szintet mértünk. A 48 és 72 órás mintákban már valamivel alacsonyabb volt mind a két transzkriptum mennyisége, de még mindig jóval az alapszint feletti értékeket figyeltünk meg.

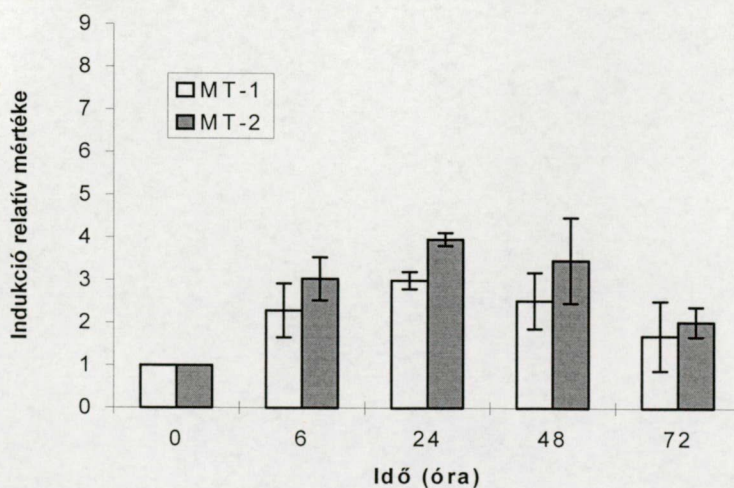


Agyban, hasonlóan a kadmium kezeléshez, nem volt mérhető változás az MT mRNS-ek mennyiségében, sem az 1 mg/l, sem pedig 10 mg/l koncentrációban alkalmazott rézkezelést követően.

**A**



**B**



**11. ábra:** A ponty MT gének indukciója 10 mg/l Cu expozíciót követően májban (A) és vesében (B). Az adatok 3-4 egyedből történt mérések átlagai.

### ***Metallothionein gének expressziója arzénal kezelt pontyban***

Az arzén, hasonlóan a másik két általunk vizsgált fémhez, tranziens indukciót eredményez az MT gének expressziójában. Az 1 mg/l koncentrációjú expozíció sem a májban, sem a vesében nem okozott mérhető változást egyik MT specifikus mRNS mennyiségében sem. Emelve az arzén koncentrációt 10 mg/l-re, az MT-2 gén mind a két szövetben indukálódott. Májban 24 óra elteltével már kétszeres volt a specifikus mRNS szint, 48 órára pedig elérte az alapszint ötszörösét és még az utolsó mérési pontban, 72 óránál is 3-szoros mennyiségben volt detektálható (12. ábra). Vesében az indukció mértéke valamelyest eltért; 24 órás arzénkezelést követően, a májban mérthez hasonlóan, kétszeresére nőtt az MT-2 mRNS szint, de az indukciós maximumban 48 óránál, csupán 3-szoros emelkedést mértünk.

Az MT-1 gén expressziója nem mutatott szövet specifikus változást az arzénkezelést követően. Mind a két szövetmintában maximum 1.8-szoros emelkedés volt mérhető 48 óránál, míg a 24 és 72 órás arzén expozíciót követően az alapszinttől szignifikánsan nem különböző értékeket mértünk (12. ábra).

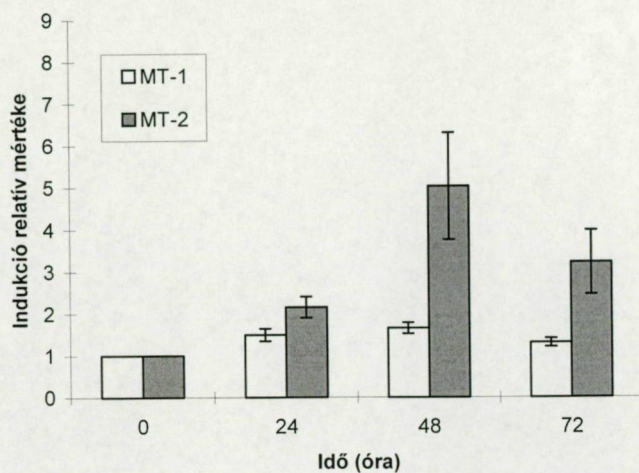
A kadmium és rézkezeléssel szemben az arzén 10 mg/l koncentrációban alkalmazva, agyban indukálta az MT gének transzkripcióját. Az MT-2 mRNS mennyisége közel kétszeresére emelkedett 24 óra elteltével és még a kezelés 72-ik órájában is egy emelkedett, 1.5-szeres szint volt mérhető. Az MT-1 mRNS mennyiségében 48 órás arzénterhelést követően kaptuk a maximum értéket (1.6-2-szeres növekedés), és még 72 óra elteltével is hasonlóan magas érték volt mérhető (12. ábra).

### ***Hőmérsékletváltozás hatása az MT gének expressziójára***

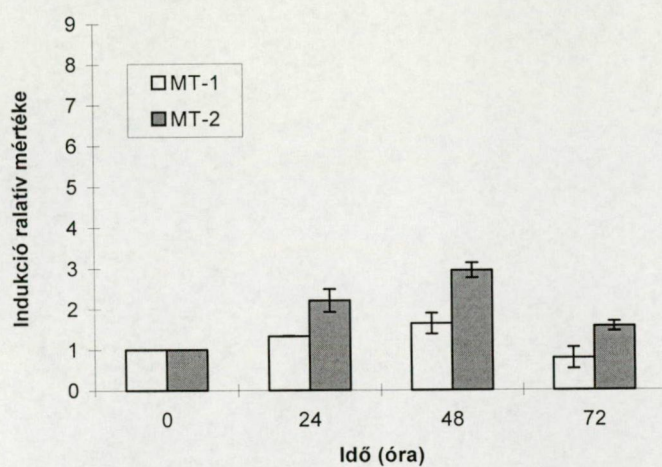
Megvizsgáltuk, hogy a vízhőmérsékletben bekövetkezett hirtelen változások hogyan befolyásolják az MT gének expresszióját. Kísérleteink során a májban és az agy



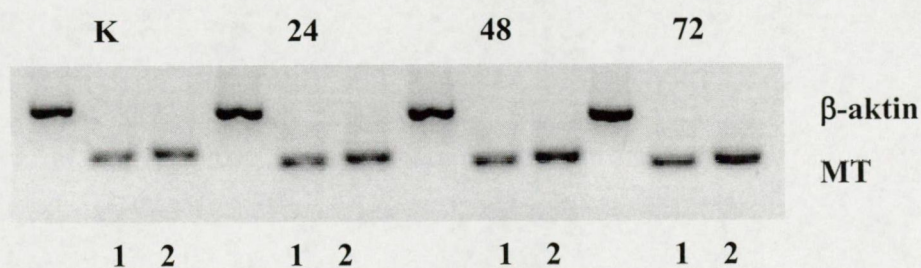
**A**



**B**



**C**



**12. ábra:** A ponty MT gének indukciója 10 mg/l As kezelés hatására májban (A), vesében (B) és agyban (C). A grafikonokon (A és B) az adatok 3-4 egyedből származó mérések átlagát jelentik. (C) Reprezentatív RT-PCR amplifikálás teljes agyból izolált RNS mintákon.

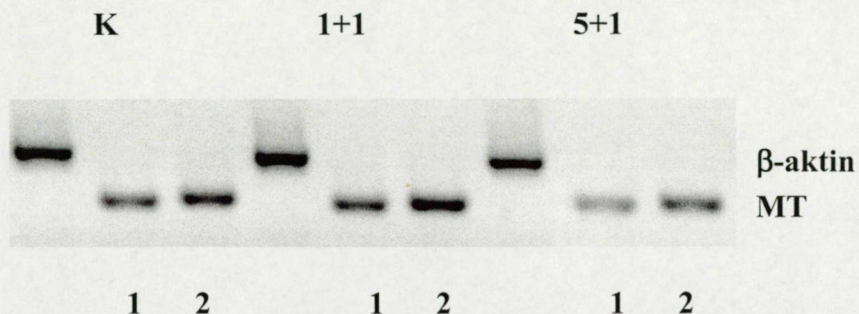
különböző területein mértük az MT mRNS mennyiségeket a hidegsokkot követő *recovery* időszakokban. A változások szövet- és gén-specifikusak voltak.

Májban a 7°C hőmérséklet csökkenés jelentős emelkedést eredményezett az 1 órás kezelést követő 1 órás *recovery* időszak elteltével: az MT-1 mRNS mennyisége 3-4-szeresére, míg az MT-2 mRNS szint 1.5-2-szeresére növekedett. Az indukció érdekessége, hogy míg a fémkezeléseknél szövettípustól és fémkoncentrációtól függetlenül az MT-2 gén indukálhatósága volt a jelentősebb, a hirtelen hőmérséklet csökkenésre inkább az MT-1 gén bizonyult érzékenyebbnek. Az indukció mind a két gén esetében tranziens volt. Az öt óra hosszan tartó hideg kezelést követő *recovery* idő után az MT-1 és az MT-2 mRNS-ek mennyisége közel azonos volt a kontroll értékekkel, az MT-1 gén expressziójában előfordult, hogy egy enyhe gátlás volt mérhető (13. ábra).

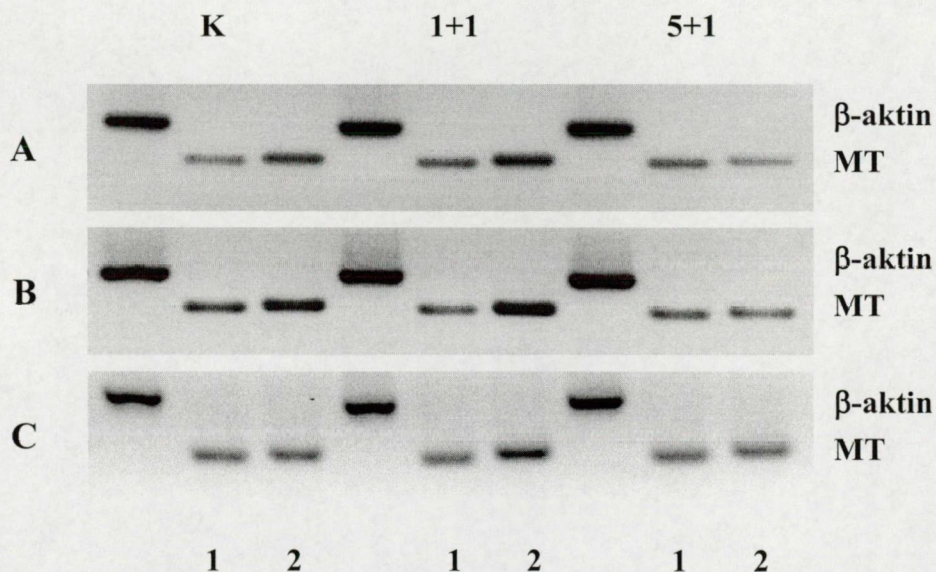
Vizsgáltuk a hidegsokk hatására bekövetkező változásokat a ponty agy különböző régióiban is. Az agyat három részre osztottuk, izoláltuk az *olfactory* lebenyt, az agy középső részét, valamint a *cerebellum*-ot. Mind a három régióban megmértük az alap MT mRNS mennyiségeket. A két MT mRNS aránya régió specifikust mutat: az *olfactory* régióban az MT-1/MT-2 arány 1-1.2, a *cerebellum*-ban 1.5-1.7 és az agy középső részében 1.4-1.6 volt. Agyban, hasonlóan a májban tapasztaltakhoz, főként az MT-1 gén expressziója változott a hidegsokk hatására. A *cerebellum*-ban és az agy középső részében egy kezdeti enyhe növekedés jellemezte az MT-1 mRNS szintet: 1+1 órás inkubálás után közel kétszeresére nőtt meg mind a két mintában a mennyisége. Az *olfactory* régióban nem, vagy maximum egy 1.5-szeres növekedést tapasztaltunk ebben az időpontban. Az öt órás kezelés mind a három agyrégióban az MT-1 mRNS mennyiségének drasztikus csökkenését eredményezte, a kontroll értékek egyharmadát mértük a *cerebellum*-ban és az agy középső részében, és felét az *olfactory* lebenyben



A



**13. ábra:** Reprezentatív RT-PCR amplifikálás kontroll és hidegkezelt halak májából izolált RNS mintákon. K: kontroll, 1+1: mintavétel az 1 óra hidegsokkot követő 1 óra *recovery* periódust követően, 5+1: mintavétel az 5 óra hidegsokkot követő 1 óra *recovery* idő után.

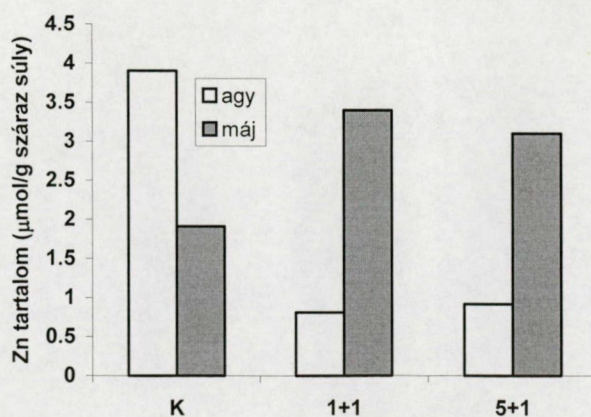


**14. ábra:** Reprezentatív RT-PCR amplifikálás kontroll és hidegsokkolt halak *cerebellum*ából (A), a középső agyrégióból (B) valamint az *olfactory* lebenyből (C) izolált RNS mintákon. K: kontroll, 1+1 és 5+1: mintavétel az 1 és 5 órás hidegkezelést követő 1 órás *recovery* időt követően.



(14. ábra). Azokban a kísérletekben, ahol az öt órás hidegsokkot követően nem csupán egy órára, hanem hosszabb időre (12 és 24 óra) helyeztük vissza az állatokat az akklimatizációs hőmérsékletre, az MT-1 mRNS mennyisége lassan visszatért az alapértékekhez: 12 óra elteltével a *cerebellum*-ban és a középső agyrégióban elérte a kontroll értékek közel 60 %-át, az *olfactory* lebenyben pedig 70 %-át, majd 24 órát követően az alapszintekhez közeli értékeket kaptunk. Agyban az MT-2 gén kifejeződését kisebb mértékben befolyásolta a hőmérséklet csökkenése, és még az öt órás hideg kezelés sem eredményezett szignifikáns változást (14. ábra).

Az MT gének expressziója mellett követtük a Zn tartalmat is a vizsgált szövet mintákban. Kezeletlen állapotban agyban a Zn mennyisége közel duplája a májban mért értékeknek. A hirtelen hőmérsékletcsökkenés következtében agyban a Zn tartalom drasztikusan esett. Az egy órás hidegsokkot követő *recovery* periódus után az agysejtek szinte „kiürültek”, a kontroll Zn mennyiségének csupán 20 %-át detektáltuk. Hasonlóan alacsony értéket mértünk a hosszabb ideig tartó (5 óra) hideg kezelést eredményeként is. Ezzel szemben a májban hidegsokk hatására emelkedett a Zn tartalom, a kezeletlen állatok májához viszonyítva közel dupla mennyiséget mértünk (15. ábra).



**15. ábra:** Zn tartalom változása májban és agyban, hidegkezelést követően. Az értékek négy hal szövetmintáinak közös homogenizátumából történt méréseket reprezentálnak. **K:** kontroll, **1+1** és **5+1:** 1 és 5 órás hidegkezelést követő 1 óra *recovery* periódus.

## 2. A *hsp90* gének izolálása és expressziójának vizsgálata

### *Ponty hsp90 specifikus cDNS-ek amplifikálása RT-PCR-rel*

A ponty *hsp90* gén(ek) RT-PCR-rel történő azonosításához, hasonlóan az MT gének izolálásához, szükségünk volt a *hsp90* géncsaládra specifikus primerekre. Az adatbázisban olyan fajokat kerestünk, melyekből már mind a kétféle *hsp90* gént, a *hsp90 $\alpha$* -t és a *hsp90 $\beta$* -t is azonosították, így az emberből, egérből, csirkéből és a zebradánióból származó szekvenciákat használtuk. A három magasabb rendű gerinces mind a két génjének a teljes kódoló szekvenciája ismert volt, míg a zebradánió *hsp90* génjeinek 5' végeiről csak egy-egy 300 bp-os szakasz azonosítása történt meg. Az aminosav-sorrendek összehasonlítása során több olyan régiót lehetett azonosítani, ami teljes mértékben konzervált volt valamennyi vizsgált faj mindkét génjére nézve. Az amplifikáló primereket (*hsp-A* és *hsp-B*) ilyen, a négy faj mindkét izoformája között aminosav szinten 100 % azonosságot mutató régiókra terveztük, melyek még nukleinsav szinten is igen nagy azonosságot mutattak: a páronkénti összehasonlításban maximum 1 nt-ban tértek el. A primerek által határolt régió viszonylag variábilis a két izoformában, pl. a zebradánió esetén a végül kiválasztott 190 bp-os szakaszon 37 pozícióban van különbség. Az RT-PCR amplifikáláshoz a templát RNS-t kezeletlen illetve 10 mg/l Cd-al kezelt ponty veséjéből izoláltuk. Mind a két reakcióban egyetlen egy terméket kaptunk melynek mérete megegyezett a *hsp90* génre specifikus termék várt méretével. Az így kapott termékpopuláció terveink szerint mind a *hsp90 $\alpha$* , mind a *hsp90 $\beta$*  gént reprezentálta. A fragmenteket izoláltuk agaróz gélből és egy PCR klónozó vektorba inzertáltuk. A két csoportból hat-hat független transzformánsból származó plazmid inzertjének határoztuk meg a szekvenciáját.

A szekvenciák elemzése alapján egyértelműen kétféle nukleotid sorrendet kaptunk (16. ábra). Mivel a DNS fragmentet PCR amplifikálással állítottuk elő, nem zárhattuk ki a PCR mutációk előfordulásának lehetőségét. Azonban az a tény, hogy a klónok két csoportjának szekvenciája 29 pozícióban tért el egy viszonylag rövid szakaszon, valószínűtlenné tette, hogy egyazon gén termékét reprezentálná a két csoport. A két génről történt amplifikálást az is bizonyítani látszott, hogy az eltérések több mint 70%-a a kodonok harmadik pozíciójában történt, amit egy véletlen PCR mutációktól nem várnánk el. Továbbá a kétféle klón megoszlása a kezeletlen és kezelt mintákból származó csoportokban eltért. A kezeletlen csoportban csak azonos nukleotid sorrenddel rendelkező cDNS-eket kaptunk, míg a másik csoportban 4:2 volt a kétféle szekvencia előfordulási aránya.

Mindkét szekvencia a legnagyobb homológiát a Genbank-ban elhelyezett *hsp90* szekvenciákkal mutatta, ezért nagy valószínűséggel gondolhattuk, hogy az általunk izolált cDNS szakaszok a ponty kétféle *hsp90* génjét reprezentálják.

Úgy nukleinsav, mint aminosav szinten egyértelmű volt a különbség az újonnan azonosított szekvenciák között (29 nt illetve 3 aminosav eltérés), azonban ahhoz, hogy kétséget kizáróan eldöntsük, hogy melyikük felel meg az  $\alpha$  illetve a  $\beta$  izoformának, nem volt elegendő az információnk. Két lehetőséget láttunk arra, hogy ezt a kérdést megválaszolhassuk. Az egyik az, ha hosszabb cDNS-t izolálunk, ahol a különbségek már egyértelművé teszik az izoformák besorolását. A másik lehetőség a funkcionális teszt volt. Az irodalom alapján tudtuk, hogy más fajokban a két gén alapexpressziója és indukálhatósága jelentősen eltér, amit vagy Northern hibridizálással vagy differenciális RT-PCR–ral terveztünk követni.

Mind a két irányban párhuzamosan próbáltunk előre lépni. Annak érdekében, hogy a két cDNS-ről képzavar nélkül beszélhessünk a továbbiakban, azokat melyek



	hsp90-A	hsp90-D	
$\alpha$	<u>GACAAGATCAGATATGAGAGTCTCACAGACCCGAGCAAGCTGGACTCTGGGAAAGACCTC</u>		60
$\beta$	GACAAGATCAGATATGAGAGCT.G..G..T..C.C...A.....AGC..C..G....CG		60
	hsp90-E	hsp90-F	
$\alpha$	AAAAATCGAAATCATTCCCAACAAACAGGAGCGCACGCTGACCCTCATCGACACCGGCATC		120
$\beta$	..G.....G.....C.....GTT..T..A.....T.....T...		120
	hsp90-G		
$\alpha$	GGCATGACCAAAGCTGACCTCATCAACAACCTGGGCACCATCGCCAAATCTGGCACCAAG		180
$\beta$	..G.....C.....T....G.....G..G...		180
	hsp90-B		
$\alpha$	<u>GCCTTCATGGAGGCTCTGCAGGCCGAGCGGACATCTCCATGATCGGTTCAGTTCGGAGTG</u>		240
$\beta$	.....T..C..A..T....T.....A.....T..T...		240
$\alpha$	GGTTTCTATTCCGCCTACCTAGTGGCCGAGAAAGTCACGGTCATCACCAAACACAACGAT		300
$\beta$	..C.....C.....G.....T..A.G.....		300
$\alpha$	GACGAGCAGTACACCTGGGAATCTGCGGCTGGTGGTTCCTTCACAGTGAAGCCAGACTAC		360
$\beta$	.....G..GT.C....A..C..T....C..C...GTG...C..		360
$\alpha$	GGTATATCCATTGGACGCGGCACCAAAGTCATTCTCCACCTTAAAGAGGATCAATCTGAA		420
$\beta$	...GAGC....C..C..T..A.....T.....G.....A.....GA.G..G		420
$\alpha$	TATGTTGAGGAGAAGCGCATCAAGGAAGTTGTGAAGAAACACTCTCAGTTCATCGGTTAC		480
$\beta$	..CA.C.....TG.G.....G..C.....T..C.....C...		480
		↓	
$\alpha$	CCCATTACGCTCTTCGTTGAGAAACAGAGAGAGAAAGAGGTTGACCTTGAAGAAGGAGAA		540
$\beta$	..A..C..T.....G.....GG.AC..C..G...ACCAG.GAC..C..G.CG..G		540
$\alpha$	AAGGAGGAGGAGGTGGTGGCCGGCGATGAGAAA-----GACAAACCCAAGATT		588
$\beta$	G.....A..CCT.A.AAA.AGGAG..G.....GAGGAAGGCGAA.....C		600
$\alpha$	GAGGACTTGGGCGCCGATGAAGATGAAGACACCAAAGATGGTCAGAACAAGAGGAAGAAG		648
$\beta$	.....G.C...T.A.....C..A..G...T.....CAAGG.C..G....AA.....		660
	hsp90-C		
$\alpha$	AAGGTCAAGGAAAAGTACATTGATGCCAGGAGCTGAATAAGACCAAGCCGATC		702
$\beta$	.....G.....C..CCAGG..GAGCTGAATAAGACCAAGCCGATC		714

**16. ábra:** A ponty *hsp90 $\alpha$*  és *hsp90 $\beta$*  részleges cDNA szekvenciák összehasonlítása. A *hsp90 $\beta$*  esetében csak az eltéréseket jelöltük, a pontok azonosságot jelentenek. Az amplifikáló és génspecifikus primerek pozícióit aláhúzás mutatja. A *hsp90 $\alpha$* -ban azonosított exon határt nyíl jelzi.



mind a kétféle RNS mintából izolálhatóak voltak *hsp90-2*-nek, a Cd-mal kezelt halakból izolált cDNS-eket pedig *hsp90-1*-nek neveztük el.

### **A *hsp90α* és *hsp90β* cDNS -ek azonosítása**

1998-ban, mire kísérleteinkkel eddig a pontig jutottunk, a GenBank-ban elérhetővé vált a zebradanio HSP90 izoformák teljes hosszúságú szekvenciája (a mai napig az egyetlen halfaj melynek mind a két *hsp90*-t kódoló szekvenciája teljes hosszában ismert). Az ember, egér, csirke és zebradanio Hsp90 fehérjék összehasonlítása alapján megterveztünk egy új 3' végi primert, a *hsp90-C*-t (lásd a 16. ábrát). A négy összehasonlított faj esetében az új oligonukleotid párunk a teljes fehérjére nézve a legvariábilisabb szakaszt határolja.

Az RT-PCR-hoz választott paraméterek, illetve az azt követő lépések megegyeztek a rövid fragmentek azonosításánál leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy az amplifikáláshoz most már csak a Cd kezelt halból származó RNS mintát használtuk fel templátként, tudva azt, hogy ebben az RNS populációban mindkét *hsp90* mRNS reprezentálva van. A *hsp90-A* és *hsp90-C* primerekkel amplifikált terméket klónoztuk, és az inzertet hordozó rekombináns plazmidokat tovább teszteltük egy *hsp90-1* specifikus *semi-nested* reakcióval (a *hsp90-D* specifikus primerre vonatkozóan lásd a 16. ábrát). Tizenhét, inzertet hordozó plazmidból 6 esetben kaptunk amplifikálást, ezek közül három inzertjének, illetve a „negatív” klónok közül is háromnak meghatároztuk a szekvenciáját.

A szekvenciák két csoportba tartoztak, igazolva a tesztelő PCR reakciók eredményét. Annak a három DNS-nek a szekvenciája, melyen működött a *hsp90-D/hsp90-B* primer pár, átfedett a *hsp90-1* szekvenciával, míg a másik csoportba tartozók a *hsp90-2* nukleotid sorrendjével voltak azonosak az átfedő régióban. A két cDNS osztály hossza 12 bp-al tért el, és nukleinsav szinten 74 % volt az azonosság közöttük

(16. ábra). Mind a két cDNS teljes hosszúságában egy-egy *open reading frame* található, a kikövetkeztetett aminosav sorrendek 79 % azonosságot mutatnak, a méretbeli eltérésük egy négy aminosavnyi *gap* bevezetésével hidalható át. A fehérjék további elemzése két olyan konzervált régió jelenlétét mutatta ki (*signature sequences* Gupta 1995) mellyel valamennyi ismert Hsp90 izoforma jellemezhető (17. ábra). A rövidebbik (658 bp) a *hsp90-1*-el fedett át és a legnagyobb homológiát a zebradánio *hsp90α* szekvenciához mutatta (86%), míg a *hsp90β*-val csak 75 % volt az azonosság. Ezzel szemben a hosszabbik szekvenciához a zebradánio *hsp90β* állt a legközelebb (89 %), és a *hsp90α*-hoz mutatott hasonlósága volt kisebb (76 %).

Zα	.....C.....L..DQK.....I.....	121
Cα	LTDP SKLDSGKDLKIEIIPNKQERTLTLTIDTGIGMTKADLINNLGTIAKSGTKAFMEALQ	60
Cβ	.....P.....VH.....	60
Zβ	....T.....D....V.....	117
Zα	.....I.....F.E.....	181
Cα	AGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYTWESAAGGSFTVKPDYGISIGRG	120
Cβ	.....R.....S.....V.H.EP....	120
Zβ	.....A..S.....V.H.EP....	177
Zα	.....YI.....Q..EE.A.	241
Cα	TKVILHLKEDQSEYVEEKRIKEVVKKHSQFIGYPITLFVEKQREKEVDLEEKEKEE--VVA	180
Cβ	.....T..I....V.....E.D..TSDD.A.E.KP--EKE	180
Zβ	.....T..I....V.....Y...E.D..ISDD.A.E.KA--EKE	237
Zα	.ED.----.....S...K.....	282
Cα	GDEK----DKPKIEDLGADEDEDTKDGQNKRRKKVKKEYIDAQ	219
Cβ	EE..EEGE.....V.S.DE..S..KDK.K...I.....QE	223
Zβ	EK.-EEGE.....V.S.DE.....KDK.K...I.....QE	279

**17. ábra:** A ponty *hsp90α* (Cα), *hsp90β* (Cβ) és a zebradánio ortológok (Zα és Zβ) összehasonlítása aminosav szinten. A teljes szekvenciát csak a ponty *hsp90α* esetében tüntettük fel, a többi esetben csak az eltérő aminosavakat jelöltük. Az amplifikáló primerek által kódolt aminosavakat az ábra nem tartalmazza. A Hsp *signature* szekvenciákat árnyékolással emeltük ki.

Ezek a karakterisztikus jegyek valamint más fajok *hsp90* szekvenciáihoz mutatott hasonlóságuk alapján nagy valószínűséggel mondhatjuk, hogy a két általunk izolált parciális cDNS közül a rövidebbik a ponty *hsp90α*, a hosszabbik pedig a *hsp90β* génjét reprezentálja.

#### ***A hsp90 gének alap expressziójának vizsgálata ponty szövetmintákban***

Ahhoz, hogy a ponty *hsp90* gének differenciális expresszióját vizsgáljuk, biztosnak kellett lennünk abban, hogy kísérleteinkben egyértelműen különbséget tudunk tenni a két *hsp90* izoforma között. Az expresszió követésére a specifikus mRNS-eket először hibridizálással próbáltuk kimutatni, a két izolált cDNS-t használva próbaként. A Northern technika hibridizálási és mosási lépéseire olyan körülményeket dolgoztunk ki, melyek között a két cDNS próba már nem kereszthibridizált. Kezeletlen állatok agyából, májából és veséjéből izolált RNS mintákhoz hibridizáltuk a *hsp90α* és *hsp90β* cDNS próbákat. Mind a két próbánkkal specifikusan csak egyetlen terméket mutattunk ki: a *hsp90α* egy 2800, a *hsp90β* egy ennél valamivel nagyobb, 2900-3000 bp hosszúságú mRNS-hez hibridizált. A *hsp90β* mRNS mind a három szövetben kimutatható volt. A kvantitatív kiértékelésből az derült ki, hogy ez a transzkriptum közel azonos mennyiségben van jelen mindhárom szervben. A *hsp90α* mRNS-t viszont szövetspecifikus megoszlás jellemezte, hibridizációval csak az agyban sikerült detektálni, a másik két szövetből származó RNS mintából még hosszabb expozíciós idő elteltével sem tudtuk kimutatni (lásd a 20., 23. és 24. ábra 0 időpontjait).

Mivel májban és vesében Northern hibridizálással csak az egyik *hsp90* transzkriptumot tudtuk kimutatni, ezért annak eldöntésére, hogy a *hsp90* géntermék egyáltalán jelen van-e ezekben a szövetekben, a jóval érzékenyebb RT-PCR amplifikálást alkalmaztunk. Ehhez, az első lépésben izolált 190 bp hosszú cDNS-ekben található eltérések alapján, *hsp90α* és *hsp90β* specifikus primereket terveztünk (lásd 16.



ábra), és meghatároztuk azokat a reakció paramétereket, ahol az izoforma-specifikus primer párok csak a nekik megfelelő templátról amplifikálnak. A hsp90-D/E primerek csakis a hsp90 $\alpha$ , míg a hsp90-F/G primer pár kizárólag a hsp90 $\beta$  templátról amplifikáltak detektálható terméket. Az agy, máj és vese össz-RNS preparátumokon végezett amplifikálás valamennyi reakcióban specifikus termékek megjelenését eredményezte.

Hasonlóan a Northern hibridizáció eredményéhez, a hsp90 $\beta$  géntermék nagy mennyiségben volt jelen mind a három szövetben (18. ábra). Ezekben a kísérletekben az MT gén vizsgálatánál jól bevált  $\beta$ -aktin mRNS mennyiségét vettük viszonyítási alapnak az expresszió relatív mértékének kifejezéséhez. A denzitometrikus kiértékelések alapján a mintákban a hsp90 $\beta$  géntermék a  $\beta$ -aktin mRNS-el közel azonos mennyiségben volt jelen: az agyban annak 90-95 %-a, míg a vesében és májban 75-80 %-a.

RT-PCR amplifikálással a hsp90 $\alpha$  transzkriptum is kimutatható volt valamennyi vizsgált szövetből. Az agyban 9-10 %-a volt a mennyisége a  $\beta$ -aktin-énak, míg májban és vesében az agyban mért szintnek körülbelül egy tizedét detektáltuk (I. Táblázat).

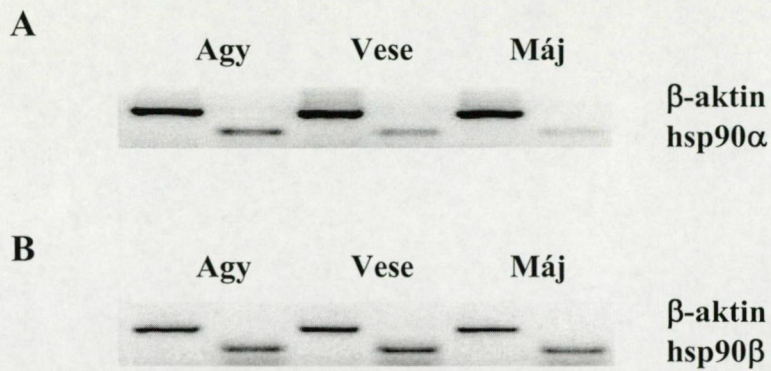
**I. Táblázat:** A hsp90 mRNS  $\beta$ -aktinhez viszonyított relatív mennyisége három szervben.

	<i>hsp90<math>\alpha</math></i>	<i>hsp90<math>\beta</math></i>
<b>Agy</b>	9.3 $\pm$ 1.3	92.2 $\pm$ 6.6
<b>Vese</b>	1.1 $\pm$ 0.5	80.4 $\pm$ 8.6
<b>Máj</b>	0.7 $\pm$ 0.1	75.6 $\pm$ 7.8

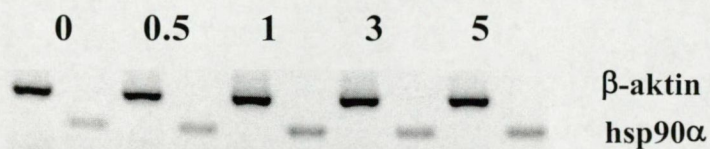
### *Hőmérsékletváltozás indukálta hsp90 gén expresszió*

Ebben a kísérletsorozatban az akvárium víz hőmérsékletét 14 illetve 18<sup>0</sup>C-kal emeltük, majd 0.5, 1, 3 és 5 óra elteltével, valamint a hőkezeléseket követő 1 óras

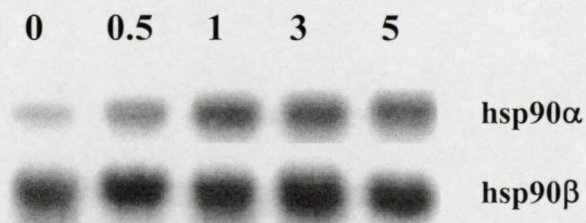




**18. ábra:** A ponty hsp90α (A) és hsp90β (B) specifikus mRNS kimutatása RT-PCR amplifikálással, indukálatlan agy, vese és máj mintákból.



**19. ábra:** Reprezentatív RT-PCR amplifikálás kezeletlen és 14°C hőmérséklet emelkedésnek 0.5, 1, 3 és 5 óra hosszan kitett halak veséjéből izolált RNS mintákon.



**20. ábra:** Northern hibridizálással kimutatott *hsp90* mRNS felhalmozódás kezeletlen és hőkezelt ponty agyban. A kísérleti körülmények azonosak voltak a 19. ábra aláírásában jelzettekkel.

*recovery* időszakot követően ellenőriztük a *hsp90* gén expresszióját májban, vesében és agyban.

Valamennyi vizsgált szövetmintában a 14<sup>0</sup>C-os hőmérséklet emelés adatait jelezzük, mivel a 18<sup>0</sup>-os hősök hatására nem tapasztaltunk magasabb indukciós értékeket. Azt meg kell jegyeznünk azonban, hogy a nagyobb hőmérséklet változás hatására jelentősebb volt a szórás a hőkezelt halak esetében.

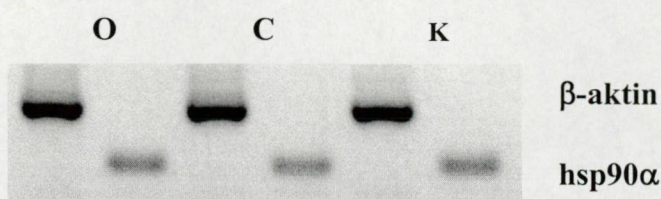
Májban és vesében Northern hibridizálással csak a *hsp90β* mRNS volt detektálható, mennyiségében nem tapasztaltunk drasztikus változást a kontroll értékekhez képest, maximum egy 1.5-2.5 szerez indukció volt mérhető az 1 órás kezelés és az azt követő 1 órás inkubációs időpontban. A *hsp90α* gén expressziójában bekövetkezett változásokat RT-PCR amplifikálással követtük. Mind a két szövetmintában azonos, relatív mennyiségét tekintve szignifikánsan nem különböző változás történt a hősök hatására. Fél órás inkubáció magas hőmérsékleten 1.5-szeres mRNS növekedést eredményezett, míg 1 óra elteltével a kontrollhoz képest 3-szoros szintet mértünk. Ebben az időpontban mértük egyébként a legmagasabb értékeket mind a két szervben, a három és az öt órás mintákban már csak 2-2.5-szeres indukciót mutattunk ki (19. ábra). A hőkezelt követő 1 óra *recovery* periódust követően nem volt jelentős változás az mRNS mennyiségekben a közvetlen hősök adatokhoz viszonyítva.

Agyban már Northern hibridizálással is követhető volt a változás a hőkezelés különböző időpontjaiban. A *hsp90β* gén kis mértékben indukálódott, maximum 2-2.5-szeres emelkedést mértünk a mRNS mennyiségében három órás hőkezelt követően. A *hsp90α* mRNS fél óra elteltével már ötszörösére, egy órás kezelést követően pedig 10-14-szeresére emelkedett (20. ábra). A 3 és az 5 órás mintavételi pontokban valamint a *recovery* idő elteltével is hasonlóan magas értékeket mértünk.



A *hsp90α* gén expressziójában bekövetkezett változásokat a víz hőmérsékletének csökkentését követően is megvizsgáltuk. Hasonlóan a MT gének expressziójánál leírtakhoz, az agy különböző területeiről és májból vettünk mintát közvetlenül a hidegsokkot, illetve a *recovery* időszakokat követően.

A kontroll állatok agyában, az *olfactory* régióban és az agy középső részén közel azonos mennyiségű *hsp90α* mRNS-t detektáltunk, míg a *cerebellum*-ban ennek az értéknek körülbelül a kétharmadát mértük (21. ábra). Az egy órás hideg kezelést követő *recovery* periódus alatt jelentősen emelkedett a specifikus mRNS mennyisége, mind a három agyterületen egy 2-2.5-szeres indukciót mértünk. Az öt órás hidegsokkot követő 1 órás *recovery* után további növekedést tapasztaltunk, valamennyi agymintában 3-4-szeresére növekedett *hsp90α* expressziót detektáltunk (22. ábra). A hosszabb akklimatizációt követően azonban drasztikusan csökkent az mRNS mennyisége mind a három agyterületről származó mintában, 12 óra elteltével már az alap értékekhez közeli szintet mértük.

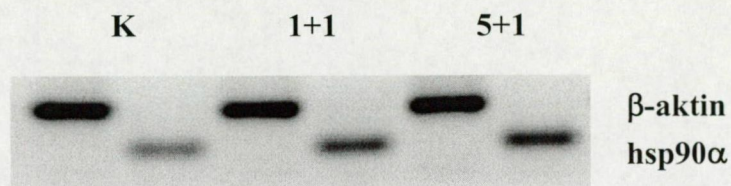


**21. ábra:** Reprezentatív RT-PCR amplifikálás kontroll hal *olfactory* lebenyéből (O), *cerebellum*-ából (C) és a középső agyrégióból (K) izolált RNS mintákon.

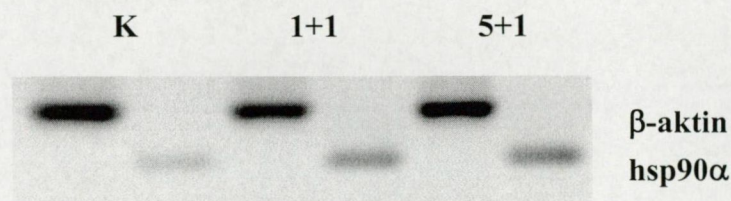
Májban hasonlóan magas indukciós értékeket mértünk a különböző időpontokban: az 1 órás inkubációt követően 2-szeres, 5 óra elteltével pedig 4-4.5-szeres növekedést figyeltünk meg (22. ábra), abszolút értékben viszont a *hsp90α* mRNS szint jóval alacsonyabb volt.



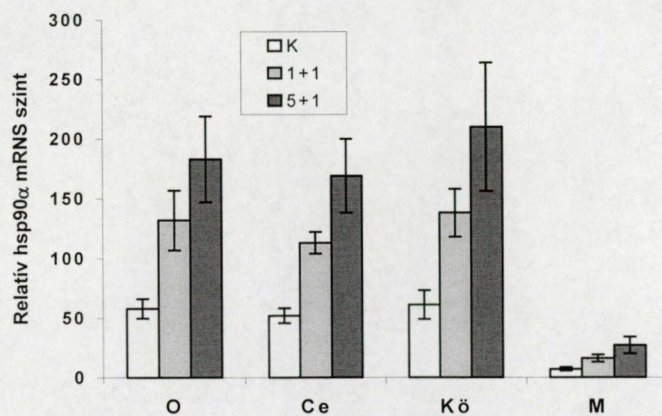
A



B



C

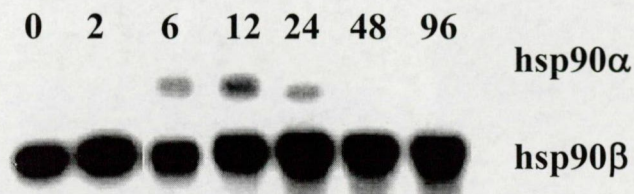


**22. ábra:** Reprezentatív RT-PCR amplifikálás hidegsokkolt halak *olfactory* lebenyéből (A) és májából (B) izolált RNS mintákon. A *hsp90α* gének indukciója (C) az *olfactory* régióban (O), a *cerebellumban* (Ce), az agy középső régiójában (Kö) és a májban (M). K: Kontroll, 1+1 és 5+1: 1 és 5 órás hidegkezelést követő 1 órás *recovery* időszak.



### *Fémkezelések hatása a hsp90 gének expressziójára*

Mivel a hőmérséklet emelése májban és vesében nem okozott jelentős növekedést a *hsp90α* expressziójában, megvizsgáltuk, hogy más fehérjekárosodást előidéző tényezők milyen hatással vannak a *hsp90* génekre. Egy héten keresztül 1 mg/l kadmium terhelésnek kitett halak májában és veséjében követtük az mRNS szint változását Northern hibridizálással. Bár a fémfelhalmozódás kimutatható volt mind a két szervben (9. ábra), egyik *hsp90* gén sem indukálódott a kezelést követően. Megnöveltük a Cd koncentrációt 10 mg/l-re, és négy napon keresztül mértük a változást. Vesében a kezelés második órájában már kimutatható volt a *hsp90α* mRNS, a legmagasabb értéket 12 óra elteltével mértük, majd a 96-ik órára, hasonlóan az alap szinthez, Northern hibridizálással már nem volt kimutatható specifikus mRNS. A kontroll értékhez nem tudunk viszonyítani, de a 2 és a 12 óra elteltével mért értékek között egy 20-25-szörös növekedést mutatható ki (23. ábra).



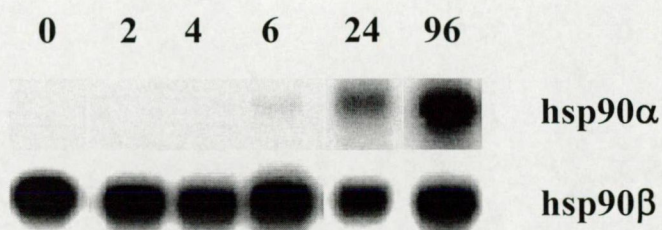
**23. ábra:** Northern hibridizációval detektált *hsp90* mRNS akkumuláció ponty vesében, 10 mg/l Cd kezelést követően, a kezelés különböző időpontjaiban (2-96 óra).

Ugyanakkor a májból izolált mintákból továbbra sem tudtuk a *hsp90α* génterméket kimutatni. Egy következő kísérletben a halakat intraperitoniálisan 10 mg/kg kadmiummal kezeltük. Hat óra elteltével már a májban is kimutatható volt a



*hsp90α* mRNS, és a fémfelhalmozódás előrehaladtával folyamatosan nőtt a mennyisége.

A negyedik napon már 200-szorosát mértük a hat órás értéknek (24. ábra).



**24. ábra:** Northern hibridizációval detektált *hsp90* mRNS akkumuláció 10 mg/kg Cd-al kezelt ponty májában, a kezelés különböző időpontjaiban (2-96 óra).

A *hsp90β* mRNS, az agyhoz hasonlóan, a kontroll állatok májából és veséjéből is könnyen kimutatható volt, viszont a kezelések során nem mértünk drasztikus változást a mennyiségükben (23. és 24. ábra).

## AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBESZÉLÉSE

A dolgozatban bemutatott munka során két fehérjecsalád, a metallothioneinek és a Hsp90 két-két tagját kódoló géneket azonosítottuk pontyban. A gének expressziójának vizsgálatára génspecifikus PCR primereket terveztünk, melyek segítségével vizsgáltuk alapexpressziójukat különböző szervekben, illetve az expressziójukban fémkezelések, valamint hő és hidegsokk hatására bekövetkező változásokat. Kísérleteinket *in vivo*, kifejlett állatokkal végeztük, így az eredmények valószínűleg jól közelítik a valós ökoszisztémákban bekövetkező változások hatásait. A génspecifikus primerek használata adott esetben gyors és érzékeny monitoring vizsgálatokra is lehetőséget nyújthat.

### **Metallothioneinek**

Két metallothionein gént azonosítottunk pontyból RT-PCR amplifikálással. Ebből a fajból Kito és munkatársai 1984-ben és 1986-ban fehérjeszinten két metallothionein izoformát azonosították (MT-I és MT-II) pontyban. Az általunk azonosított két cDNS közül az MT-1 által kódolt fehérje aminosavösszetétele jó egyezést mutat az MT-I-nek nevezett, májból izolált fehérje aminosav tartalmával, a nem túl lényeges különbség betudható az aminosavösszetétel-meghatározás pontatlanságának. Továbbá az MT-1 cDNS szekvenciája egy, aminosav cseréhez nem vezető nukleotid különbséggel azonos az AF249875 referenciaszámú szekvenciával (GenBank, Shiu és mtsi, 1997). A fentiek alapján nagy biztonsággal állíthatjuk, hogy az általunk azonosított MT-1 gén azonos az MT-I-el, illetve az általa kódolt fehérje az azonos néven leírt géntermékkel. (Az arab/római számmal való megkülönböztetés okát lásd alább.) Az MT-2 cDNS által kódolt fehérje viszont aminosav összetételét illetően jelentősen eltér az MT-II-től, ezért nagy valószínűséggel nem azonos vele, bár hordoz

néhány az MT-II fehérjét jellemző karakterisztikus jegyet (Bargelloni és mtsi, 1999), pl. jellemző rá az MT-1 fehérjéhez képest emelkedett Thr és csökkent Lys tartalom. Ezért az MT-2 azonosítása pontyban újdonságnak számít.

Genomiális DNS-ről történő amplifikálással nemcsak a teljes kódoló szekvenciát, hanem a strukturgéneket, illetve a kódoló régiótól 5' irányba eső szakaszokat is izoláltuk. Az exonok szekvenciája mindkét gén esetében azonos volt a cDNS-ek szekvenciájával, így valószínűsíthető, hogy valóban az azokat kódoló géneket sikerült azonosítanunk. A kódoló szekvenciákat két-két intron szakítja meg, mely az ismert gének mindegyikében megfigyelhető, evolúciósan konzervált pozíciókban. Az első intronok mérete (125 bp) beleesik a halakban eddig megfigyelt tartományba (108-135 bp), viszont a második mindkét esetben rövidebb annál, (77 bp az MT-1 és 84 bp az MT-2 esetében, szemben az eddig megfigyelt 90-170 bp-al). Az általunk azonosított MT-1 és a publikált MT-I gének intron szekvenciái között komoly eltérés van, ami egyértelművé teszi, hogy nem azonosak egymással, annak ellenére, hogy azonos fehérjét kódolnak. Az igen jelentős különbség miatt nehezen képzelhető el, hogy a nagy földrajzi távolság (Magyarország/Hong Kong) miatti populáció-izoláltság tükröződik a szekvenciákban, legegyszerűbb azt feltételeznünk, hogy allelikus variációról van szó. A ponty tetraploid génkészletet hordoz (Uyeno és Smith 1972), és a négy kópia között elképzelhető ilyen fokú divergencia, különösen a szelekciós nyomásnak nem kitett intron területeken. Miután egyik esetben sincs kísérletes bizonyíték a funkcionalitásra, azt sem zárhatjuk ki teljes bizonyossággal, hogy egyik, vagy mindkét esetben inaktív génről van szó. Azt a feltevést, hogy azonos fehérjét kódoló, de eltérő szabályozás alatt álló génekről lenne szó, nem tartjuk valószínűnek, mivel a két gén promóter régiója az ismert szakaszon 5 bp eltéréssel azonos egymással, és az eltérések nem érintik a feltehetően funkcionális területeket.



Az "aktív gén" változat mellett komoly közvetett bizonyítékok sorakoztathatók fel. Mind az MT-1, mind az MT-2 esetében a transzlációs starttól 5' irányba található egy TATA box, melyek távolsága (97 és 111 bp) jó egyezést mutat az összes eddig leírt MT génben fajtól függetlenül megfigyelt távolsággal (90-109 bp). Továbbá a TATA box fölött, 91-97 bp-on belül több transzkripciós faktor kötőhelye is megtalálható (MRF, Sp1, Cp1). Emlősökben, és néhány esetben halakban is leírták, hogy a funkcionális szempontból fontos MRE szekvenciák –120 bp-on belül találhatóak, és pisztráng esetében ez a promóter szakasz emberi máj eredetű sejtenyészetben (Hep G2) is funkcionális volt (Zafarullah és mtsi, 1988). A –300 bp-os régió kívül vagy nem találtak MRE motívumokat, vagy pedig azok csak a TATA-közeli MRE szekvenciákkal együtt gyakoroltak lényeges hatást a transzkripcióra. Az MT-1 és MT-2 promóterekben talált motívumok pozíciója beleillik a fenti képbe, így feltételezhető, hogy mindkét általunk azonosított gén funkcionális. Mai ismereteink szerint nincs a szekvenciákban olyan információ, ami ennek ellenkezőjére utalna. Érdekességgként említhető meg, hogy hal MT géneknél eddig még nem találtak Sp1-kötő szekvenciákat. Úgy tűnik, hogy az általunk leírt két gén halakban az első, melyek aktivitását az Sp1 potenciálisan befolyásolja.

A 3' nem kódoló régiókban azonosított szekvencia különbségek alapján tervezett primerek segítségével lehetőség nyílt a két gén expressziójának specifikus vizsgálatára, alap és indukált körülmények között. Azt találtuk, hogy alapállapotban az MT-1 mRNS közel azonos mennyiségben van jelen az agyban, izomban, májban és vesében, míg az MT-2 transzkriptum szintje jelentős variabilitást mutatott, de mindegyik esetben kevesebb volt az MT-1-énél. Ez a relatíve stabil MT-1 expresszió és az MT-2 mRNS szint fluktuációja a különböző szövetekben utalhat a két gén fiziológiás

körülmények között eltérő szerepére, ahol az MT-2 géntermék szövetspecifikus funkciót láthat el.

A különböző évszakokban elvégzett kísérleteink is az MT-2 génexpresszió variabilitását hangsúlyozzák. Az alap MT fehérje szint szezonális érzékenységet már 1987-ben leírták: pisztráng májban jelentős MT (MTA + MTB) növekedést tapasztaltak (Olsson és mtsi, 1987) az ovulációs időszakban. Egy másik halfajban (*winter flounder*), ugyancsak a szexuális aktivitás időszakában, a máj Zn és Cu tartalmának emelkedést figyelték meg (Shears és Fletcher 1983). Az, hogy a ponty MT-2 mRNS mennyiségi növekedése az ivási időszakban a megnövekedett Zn forgalomnak a következménye vagy annak az előfeltétele, esetleg a hormonális változások eredménye, nem tudjuk. Feltételezhető, hogy a szervezet metabolikus aktivitásának fokozódása nagyobb MT kapacitást igényel, és ez a méréseink alapján izoforma specifikusnak tűnik. Kérdésként merülhet fel az is, hogy pl. agyban miért nem tapasztaltunk a tavaszi időszakban a májhoz hasonló változást az MT mRNS alapszintben. Elképzelhető, hogy az agynak bizonyos régióiban szintén történt változás, de mivel ezekben a kísérletekben a teljes agyat vizsgáltuk, az arányok eltolódása miatt ez nem volt mérhető.

A dolgozatban bemutatott munka során megvizsgáltuk különböző stresszorok hatását a két gén expressziójára, májban, vesében és agyban. Ennek során háromféle fémion, a Cd, Cu és az As hatását mértük kétféle koncentrációban, illetve vizsgáltuk a hő- és hidegsokk hatására bekövetkező változásokat. Azokban az esetekben, ahol expresszió változást tudtuk kimutatni, az indukció mindig tranziens volt, függetlenül a kezelés természetétől illetve fémek esetében az alkalmazott koncentrációtól. Ez arra utal, hogy a megfigyelt hatás az adott gén fiziológiás szabályozását tükrözi, nem pedig aspecifikus kísérleti műtermék.

A három fém közül egyértelműen a Cd bizonyult a leghatékonyabb induktornak, már 1 mg/ml koncentrációban is erősen növelte mind az MT-1, mind az MT-2 expresszióját, májban és vesében is. A réz ebben a koncentrációban csak az MT-2 transzkripcióját fokozta, az As pedig ilyen alacsony koncentrációban egyik gén expresszióját sem befolyásolta mérhetően, a vizsgált szervekben. Ez az általános kép azonban árnyalt, a két gén expressziójában jelentős fém és dóziszfüggésbeli valamint szövet- és izoforma-specifikus különbségeket tapasztaltunk.

Mindenekelőtt megállapíthatjuk, hogy az MT-2 gén mindegyik fémkezelés során, májban és vesében is jobban indukálódott, mint az MT-1. Úgy tűnik, utóbbi már 1 mg/l Cd koncentrációnál is közel kerül indukálhatósága felső határához, hiszen tízszer nagyobb fémkoncentráció is csak egy mérsékelt, 5-20%-os további növekedést eredményezett mindkét szervben. Ugyanakkor azonos fémkoncentráció emelkedés hatására az MT-2 gén expressziója továbbra is dinamikusan változott, és közel duplája volt az alacsonyabb koncentrációnál mért értéknek.

A Cu általában gyengébb MT-2 induktornak bizonyult a Cd-nál, még 10 mg/ml koncentrációban is, pl. az indukció foka májban csak fele, vesében pedig harmada volt a hasonló koncentrációban alkalmazott Cd által elértnek. Ugyanakkor az MT-1 gént a Cd-hoz hasonló hatékonysággal indukálta mindkét szövetben.

A vizsgált szervek között nem csak a két MT gén alapexpressziójában, hanem azok indukálhatóságában is jelentős különbséget találtunk. Egy adott fémre és adott koncentrációnál a legmagasabb indukciós szinteket mindig májban mértük. Vesében azonos expozíciónál, fémtől függetlenül, mind az MT-1, mind az MT-2 indukciója csak 50-75%-a volt a májban mért értéknek. Ez alól egyetlen kivételt tapasztaltunk, a Cd 10 mg/l koncentrációban a vesében is a májhoz hasonlóan jól indukálta az MT-2-öt. Az agyban sem a Cd, sem pedig a Cu nem indukálta egyik MT gént sem. Az As ebből a

szempontból különleges volt. Annak ellenére, hogy a három fém közül a leggyengébb MT indukáló szernek bizonyult, az agyban viszonylag mérsékeltén ugyan (1.8-2-szeres növekedés), de egyetlenként fokozta mindkét MT gén transzkripcióját.

A fizikai stresszorok közül a halak környezetének hirtelen hőmérsékletváltozásit vizsgáltuk az MT gének expressziójára. A víz hőmérséklet emelése nem okozott mérhető változást egyik MT mRNS mennyiségében sem. Valószínűnek tartjuk, hogy az MT géneknek ez az „érzéketlensége” a hőmérsékletemelkedésre valós fizioiógias szabályozásukat tükrözi, mivel a kísérleteket különböző hőmérsékleteken és viszonylag széles időskálán végeztük el, valamint más stressz gének, mint például a *hsp70* és *hsp90* expressziója jelentősen megemelkedett a kezelések különböző időpontjaiban. Bár ezen a téren kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, hal sejtvonalakon végzett kísérleteik alapján mások is hasonló konklúzióra jutottak (Heikkila 1982; Misra és mtsi, 1989).

A víz hőmérsékletének hirtelen csökkenése ezzel szemben jelentős változást eredményezett az MT gének expressziójában. A változások szövet és izoforma specifikusan jelentkeztek. Májban, az egy órás hidegsokkot követően a Cd kezeléssel összevethető növekedést mértünk mindkét mRNS mennyiségében, míg az öt órás inkubáció elteltével már nem volt jelentős változás a kezeletlen halak MT mRNS szintjéhez képest. A különböző agyterületekről vett mintákban nem, vagy jóval moderáltabb növekedést észleltünk az 1 órás kezelést követő *recovery* időszakban, viszont 5 óra elteltével a kontrollhoz képest drasztikus csökkenés jellemezte az MT mRNS mennyiségét. Ahogy a fémkezeléseknél, itt is különbség mutatkozott az MT-1 és MT-2 gének szabályozásában, azonban a hőmérséklet csökkenés inkább az MT-1 gén expresszióját befolyásolta.

Az, hogy a hipotermia befolyásolja a metallothionein gének expresszióját, nem példa nélkül álló a szakirodalomban, bár a kérdést kevés közlemény vizsgálja. Egereket

hidegsokk előkezelésnek kitéve vizsgálták a Cd toxicitását, ahol a hőmérséklet csökkenés hasonló mértékű védettséget biztosított a Cd-al szemben, mint amit az alacsony dózisu fémkezelésekkel értek (Baer és Benson 1987). Egér és patkány barna zsírsejtekben jelentős mértékű MT-I mRNS növekedést mértek hideg kezelést követően, míg a fehér zsírsejtekben hasonló változást nem tapasztaltak (Beattie és mtsi. 2000). A fentiekhez hasonló indukciós hatást észleltünk mi is a májban. Az MT-1 génnek az agyban észlelt mérsékelt indukciója, majd ezt követően az expresszió az alapérték alá való csökkenése ennél mindenképpen összetettebb jelenség, és nehéz magyarázatot találni rá. A Cd kezelés, ami más szövetekben bizonyítottan jó metallothionein induktor, patkány laterális prosztatában a MT-I és MT-II transzkripciójának 50%-os csökkenését eredményezte. A jelenséget a szerzők a szövet igen magas Zn tartalmával, illetve a Cd hatására felborult Zn háztartással hozták összefüggésbe.

Carrasco és munkatársai (1999) lokális fagyasztás hatását patkány agyrégiókon vizsgálva azt találták, hogy a sejtek Zn tartalma a fagyasztott terület környékén jelentősen lecsökkent. Izgut-Uysal és munkatársai (2000) patkány szövetmintákban vizsgálták a Zn, Cu és Mg szint alakulását hideg kezelést követően. Hasonlóan az előző csoport eredményéhez, ők is csökkenést tapasztaltak az agysejtek Zn tartalmában. A mi eredményeink is azt mutatják, hogy agyban a hőmérséklet hirtelen esése a sejtek Zn tartalmának drasztikus csökkenéséhez vezet. Tudjuk, hogy az MRF aktivitásához Zn szükséges. Elképzelhető tehát, hogy az agy Zn tartalmának csökkenése az MT expressziójának csökkenéséhez vezethet. Ezt a következtetést látszik alátámasztani az is, hogy májban, ahol ellentétes irányba változott a Zn tartalom, az MT-k indukciója után nem tapasztaltunk csökkenést.



### ***hsp90* gének**

A dolgozatban bemutatott munka során két *hsp90* gént azonosítottunk pontyból. Mindkét RT-PCR-al izolált részleges cDNS egy nyitott leolvasási keretet tartalmaz, az általuk kódolt 263 aminosav hosszú fehérjerészletek más fajok Hsp90 $\alpha$  és Hsp90 $\beta$  fehérjeihez mutatják a legnagyobb hasonlóságot. A nukleinsav és aminosav szekvenciákon alapuló besorolást a két gén jellegzetes expresszió-mintázata is alátámasztja. A *hsp90 $\beta$*  nem induktív körülmények között - más, közeli rokon fajokhoz hasonlóan - viszonylag magas szinten expresszálódik minden vizsgált szövetben, az mRNA mennyisége összemérhető a  $\beta$ -aktin mRNA mennyiségével (Krone és Sass 1994; Meng és mtsi, 1995; Ali és mtsi, 1996; Quraishi és mtsi, 1996). A *hsp90 $\alpha$*  ezzel szemben minden vizsgált szervben közel százszor alacsonyabb alapexpresszióval rendelkezik, kivéve az agyat, ahol a többi szervhez képest közel tízszer magasabb szinten nyilvánul meg. Az alacsony alapexpresszió szintén jellemző más fajok *hsp90 $\alpha$*  génjeire, és az agyban mért, relatíve magas *hsp90 $\alpha$* -specifikus mRNA szintről szintén beszámoltak (Meng és mtsi, 1993, 1995; Quraishi és mtsi, 1996; D'Souza és Brown 1998). Mindezek, és az alább tárgyalt indukciós tulajdonságok alapján nagy biztonsággal nevezhetjük a két parciális cDNS által azonosított gént *hsp90 $\alpha$* -nak és *hsp90 $\beta$* -nak.

A két ponty Hsp90 szekvencia aminosav szinten 79%-ban azonos. A különbségek azonban nem egyenletesen oszlanak meg a szekvencián belül: az első 161 aminosav területén 12 szubsztitúció található, míg a fennmaradó 62 aminosav 31 pozícióban különbözik. Ez a jellegzetes különbségeloszlás más fajok esetében is megtalálható, ahol ismert a Hsp90 $\alpha$ /Hsp90 $\beta$  fehérjepár szekvenciája. Moore és munkatársai 1987-ben vetették fel, hogy a két *hsp* gén egy ősi szekvencia duplikációjaként, majd az ezt követő divergens evolúció eredményeként jött létre. A

nagyon erős aránytalanság jelentheti azt, hogy a fehérjék ezen területe funkcionális szempontból nem fontos, így viszonylag szabadon mutálódhatott az evolúció során. Utalhat viszont arra is, hogy a két gén, az ősi duplikációt követően egymástól függetlenül lett gazdagabb egy-egy exonnal melyek szekvenciája jelentősen eltérő volt. Valóban, a dolgozatban nem bemutatott kísérleteink eredménye azt mutatja, hogy az erősen divergens régiók elején található egy exon/intron határ a ponty *hsp90α* génjében (nyíllal jelölve a 16. ábrán). A független exon-szerzési hipotézisünket az is alátámasztja, hogy bár a két paralóg erősen különbözik, az ortológ formák szekvenciái ezen a területen nagyon hasonlóak (pl. szemben a ponty Hsp90α és β izoformákat jellemző 31 aminosav különbséggel ezen a szakaszon a zebradanió és ponty β ortológok között mindössze 4 aminosav az eltérés). Ez nem teszi lehetővé, hogy a mutációk felhalmozódását a régió nem funkcionális jellegével magyarázzuk.

Megvizsgáltuk a két hsp gén indukciós tulajdonságait hő és hidegsokk, valamint Cd kezelés hatására, májban, vesében és agyban. A *hsp90β* a vizsgált szervekben kevéssé reagált a hőkezelésre, szövettől függetlenül egy mérsékelt, 1.5-2-szeres indukciót figyeltünk meg. Hasonló, nem szövetspecifikus, hősokra relatíve érzéketlen expressziót figyeltünk meg a lazac, a béka és a nyúl *hsp90β* génjének esetében is (Ali és mtsi, 1996; Quraishi 1996, Pan és mtsi, 2000). Érdekes, hogy sejt kultúrában, hőmérséklet növelés hatására a csibe *hsp90β* mRNS csökkenést mutat, az alap transzkripciója a génnek vagy az mRNS stabilitása inkább negatívan befolyásolt magasabb hőmérsékleten (Meng 1995).

A *hsp90α* viszont szövetspecifikusan reagált a hősokra: agyban 10-14-szeres, míg vesében és májban csak 2-3-szoros indukciót detektáltunk. Az agyban mért magas alapszint és az erős indukálhatóság arra utalhat, hogy a *hsp90α* ebben a szervben specifikus funkciót láthat el. A *hsp90α* expresszióját korábban vizsgálták zebradanió

embriókban, és nem mutatták ki a fejlődő agyban és gerincvelőben (Krone és mtsi, 1997). A mi megfigyelésünk nem szükségképpen mond ellent ennek az eredménynek, hiszen a fejlődő embrióban egy adott gén szabályozása jelentősen eltérhet egy kifejlett állat által igényelttől. Hősokk hatására viszont a hivatkozott szerzők is jelentős *hsp90α* indukciót figyeltek meg a fejlődő központi idegrendszerben is.

A hidegsokk szintén indukálta a *hsp90α* expressziót, de kisebb különbséggel az egyes szervek között: agyban 3-4 szerez, májban 4-4.5-szeres indukciót mértünk. A maximális indukciót már közvetlenül a hidegsokk után is mérni tudtuk, az ezt követő 1 óra *recovery* periódus nem növelte lényegesen az expressziós szintet.

A *hsp90α* expresszió vesében és májban meglepően érzéketlennek bizonyult a hősokkal szemben. Ezért megvizsgáltuk a gén indukálhatóságát Cd-al is, ami ismert, általános fehérjekárosodást okozó ágens. 10 mg/l koncentrációnál a vesében erős, legalább 20-25-szörös, tranziens *hsp90α* indukciót detektáltunk, míg a májban még ennél a koncentrációnál sem észleltünk expresszió növekedést. A tranziens indukció arra utal, hogy a gén fiziológiás körülmények között is indukálható a vesében, azt azonban nem gondoljuk, hogy ennek a Cd lenne a specifikus indukálószer. Valószínűleg létezik egy eddig még nem azonosított fiziológiás, vagy a környezetből eredő szignál, amelyre a *hsp90α* ilyen mértékű reakciója kifejlődött az evolúció során, és a Cd történetesen "modellezte" ezt a fiziológiás jelet. A májban csak 10 mg/kg intraperitoneális Cd kezelés hatására nőtt meg a *hsp90α* expresszió, a kísérlet végpontjában minimum 200-szoros expresszió növekedés volt mérhető.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Ábrahám Magdolnának és Dr. Nemcsók Jánosnak, hogy munkámat a Biokémiai tanszéken lehetővé tették.

Külön köszönettel tartozom Dr. Ábrahám Magdolnának, aki egyben a témavezetőm is volt. Érdeklődése és lelkesedése a molekuláris biológiai megközelítés iránt tette lehetővé a Biokémiai tanszéken egy molekuláris csoport elindulását. Köszönöm erőfeszítését, mellyel biztosította a kutatás feltételeit.

Köszönöm a Biokémiai tanszék minden dolgozójának azt az érdeklődést, támogatást mellyel munkámat követték.

Külön köszönettel tartozom Dr. Banka Lajosnak és F.Vadadi Lászlónénak, kiknek a halkezeléssel kapcsolatos technika tanácsai nagy segítséget jelentettek munkám során.

Végül férjemnek, Dorgai Lászlónak szeretném kifejezni őszinte hálámat. Szakmai és emberi segítsége nélkül e dolgozat nem készülhetett volna el.

## **Publikációjegyzék**

### ***A dolgozathoz kapcsolódó közlemények:***

**Hermesz, E., Ábrahám, M., Nemcsók, J.:** Changes in tissue specific expression of two metallothionein genes in common carp during waterborne cadmium exposure and temperature shock. *Comparative Biochem. and Physiol. Part C*, 128/3: 457-465, 2001.

**Hermesz, E., Abraham, M., Nemcsók, J.:** Identification of two hsp90 genes in carp. *Comparative Biochem. and Physiol. Part C*, 129/4: 397-407, 2001.

**Hermesz, E., Gazdag, P. A., K. Said Ali, Nemcsók, J., Ábrahám, M.:** Differential regulation of the two metallothionein genes in common carp.

*Acta Biologica Hungarica* Közlésre elfogadva,

### ***Poszterek, előadások, magyarnyelvű közlemények:***

Ábrahám Magdolna, **Hermesz Edit**, Szegletes Tivadar, Nemcsók János: Molecular stress response in fish. Environmental Biochemistry of heavy metals, Nyíregyháza, Január, 1997.

**E. Hermesz**, János Nemcsók and Ábrahám Magdolna: Identification of an HSP70-like Gene in Carp. Stress of Life International Congress of Stress, Budapest, 1997.

Ábrahám M., **Hermesz E.**, Deér A. Nemcsók J: Molecular defense systems in fish. Stress of Life International Congress of Stress, Budapest, 1997.

Ábrahám M., Banka L., Deér A., **Hermesz E.**, Juhász M., Kotormán M., Krizsik A., Nemcsók J.: Novel Methods of Biochemistry of Water Pollution in Lake Balaton. Conference on Lakes Conservation and management. Lacar, Argentina, 1997.

**Hermesz E.**, Nemcsók J., Ábrahám M.: Stress response in fish. III International congress of Pathophysiology, Lahti, 1998.



Ábrahám M., **Hermesz E.**, Banka L., Deér A., Nemcsók J: Fish toxicology from molecular point of view. Xecotox meeting, Antalya, Törökország, 1998.

M. Ábrahám, **E. Hermesz**, A. Deér, L. Banka, J. Nemcsók: A nehézfém stressz és stresszválasz pontyban. *Biokémia*, 23: 34-37 1999.

**Edit Hermesz**, Khaled Said Ali, Magdolna Ábrahám: Identification of two *hsp90* genes in carp. MESAEP & SECOTOX 11 th International Symposium, Limassol, Cyprus, 2001.

***A dolgozathoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények***

Arányi, P., **Hermesz, E.**, Venetainer, A.: Hydrogen bond structure in the glucocorticoid agonist-receptor complex. *Biochem. Pharmacology*, 34: 2040-2042, 1985.

Olasz, F., Dorgai, L., Papp, P., **Hermesz, E.**, Kosa, E., Orosz, L.: On the site specific recombination of page 16-3 of *Rhizobium meliloti*: identification of genetic elements and att recombinations.

*Mol.Gen.Genet.*, 201: 289-295, 1985.

Venetainer, A., Poliard, A., Poliard, M., **Hermesz, E.**, Salatrepat, J.M.: Activation of alpha-fetoprotein synthesis in rat hepatoma cells with reduced sensitivity to dexamethasone.

*Differentiation*, 32: 148-156, 1986.

**Hermesz, E.**, Olasz, F., Dorgai, L., Orosz, L.: Stable incorporation of genetic material into the chromosome of *Rhizobium meliloti* 41: construction of an integrative vector system.

*Gene*, 119: 9-15, 1992.

**Hermesz, E.**, Mackem, S., Mahon, K.A.: RPX: A novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate, and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development*, 122: 41-52, 1996.

Zhao, Y., **Hermesz, E.**, Yarolin, M., Westphal H.: Genomic structure, chromosomal localization and expression of the human LIM-homeobox gene LHX5. *Gene*, 260: 95-101, 2000.

***Közlésre benyújtott kéziratok:***

**Edit Hermesz**, Lisa Williams-Simons, Kathleen A. Mahon: A novel inducible element, activated by contact with Rathke's pouch, is present in the regulatory region of the *rpx* homeobox gene. *Development*.

M. Szente, Z. Gajda., K. Said Ali, **E. Hermesz**: Involvement of electrical coupling in the *in vivo* ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience*.

Össz IF: 24.849

Független idézettség: 148

## IRODALOMJEGYZÉK

**Albores A**, Koropatnick J, Cherian GM, Zelazowski JA. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chem-Biol Interactions* 1992, 127-140.

**Ali A**, Krone PH, Pearson DS, Heikkila JJ. Evaluation of stress-inducible hsp90 gene expression as a potential molecular biomarker in *Xenopus laevis*. *Cell Stress Chaperones* 1996, 1, 62-69.

**Andrews GK**. Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Food Nutr Sci* 1990, 14, 193-258.

**Antonsson C**, Whitelaw ML, McGuire J, Gustafsson JA, Poellinger L. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol* 1995, 15, 756-765.

**Baer KN**, Benson WH. Influence of chemical and environmental stressors on acute cadmium toxicity. *J Toxicol Environ Health* 1987, 22, 35-44.

**Bardwell JC**, Craig EA. Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol* 1988, 170, 2977-2983.

**Bargelloni L**, Scudiero R, Parisi E, Carginale V, Capasso C, Patarnello T. Metallothioneins in Antarctic Fish: Evidence for Independent Duplication and Gene Conversion. *Mol Biol Evol* 1999, 16, 885-897.

**Beattie JH**, Wood AM, Trayhurn P, Jasani B, Vincent A, McCormack G, West AK. Metallothionein is expressed in adipocytes of brown fat and is induced by catecholamines and zinc. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, 278, 1082-1089.

**Blackman RK**, Meselson M. Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila* hsp82 gene. *J Mol Biol* 1986, 188, 499-515.

**Cadepond F**, Binart N, Chambrud B, Jibard N, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Baulieu EE. Interaction of glucocorticosteroid receptor and wild-type or mutated 90-kDa heat shock protein coexpressed in baculovirus-infected Sf9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90, 10434-10438.

**Carrasco J**, Giralt M, Molinero A, Penkowa M, Moos T, Hidalgo J. Metallothionein (MT)-III: generation of polyclonal antibodies, comparison with MT-I+II in the freeze lesioned rat brain and in a bioassay with astrocytes, and analysis of Alzheimer's disease brains. *J Neurotrauma* 1999, 11, 1115-1129.

**Carver LA**, Jackiw V, Bradfield CA. The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *J Biol Chem* 1994, 269, 30109-30112.

**Catelli MG**, Binart N, Jung-Testas I, Renoir JM, Baulieu EE, Feramisco JR, Welch WJ. The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J* 1985, 4, 3131-3135.

**Chambraud B**, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 1990, 265, 20686-20691.

**Cherian MG**. The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ Health Perspect* 1994, 102, Supl 3, 131-135.

**Choudhuri S**, McKim JM Jr, Klaassen CD. Role of hepatic lysosomes in the degradation of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, 115, 64-71.

**Csermely P**, Schnaider T, Söti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 1998, 79, 129-168.

**Csermely P**, Schnaider T, Szanto I. Signalling and transport through the nuclear membrane. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1241, 425-451.

**Czar MJ**, Galigniana MD, Silverstein AM, Pratt WB. Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Biochemistry* 1997, 36, 7776-7785.

**D'Souza SM**, Brown IR. Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development. *Cell Stress Chap* 1998, 3, 188-199.

**Dalton T**, Palmiter RD, Andrews GK. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metalresponse promoter elements. *Nucleic Acids Res* 1994, 22, 5016-5023.

**De Conto Cinier C**, Petit-Ramel M, Faure R, Bortolato M. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull Environ Contam Toxicol* 1998, 61, 793-799.

**der Straten A**, Rommel C, Dickson B, Hafen E. The heat shock protein 83 (Hsp83) is required for Raf-mediated signalling in *Drosophila*. *EMBO J* 1997, 16, 1961-1969.

**Durkin AS**, Maglott DR, Vamvakopoulos NC, Zoghbi HY, Nierman WC. Assignment of an intron-containing human heat-shock protein gene (hsp90 beta, HSPCB) to chromosome 6 near TCTE1 (6p21) and two intronless pseudogenes to chromosomes 4 and 15 by polymerase chain reaction amplification from a panel of hybrid cell lines. *Genomics* 1993, 18, 452-454.

**Eller-Jessen K**, Crivello FJ. Subcutaneous NaAs<sup>3+</sup> exposure increases metallothionein mRNA and protein expression in juvenile winter flounder. *Aquat. Toxicol* 1998, 42, 301-320.

**Ellis J**. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 1987, 328, 378-379.

**Erkine AM**, Adams CC, Gao M, Gross DS. Multiple protein-DNA interactions over the yeast HSC82 heat shock gene promoter. *Nucleic Acids Res* 1995, 23, 1822-1829.

**Farrelly FW**, Finkelstein DB. Complete sequence of the heat shock-inducible HSP90 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1984, 259, 5745-5751.

**Feinberg AP**, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt Biochem* 1983, 132, 6-13.

**Fowler BA**, Hildebrand CE, Kojima J, Webb M. Nomenclature of metallothionein. In: Metallothionein II., (Kagi J.H.R, Kojima Y. eds), Birkhauser-Verlag, Basel, 1987 19-22.

**Freeman BC**, Morimoto RI. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J* 1996, 15, 2969-2979.

**Galigniana MD**, Scruggs JL, Herrington J, Welsh MJ, Carter-Su C, Housley PR, Pratt WB. Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol Endocrinol* 1998, 12, 1903-1913.

**Goering PL**, Klaassen CD. Resistance to cadmium-induced hepatotoxicity in immature rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984, 74, 321-329.

**Grenert JP**, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E, Kruttsch H, Ochel HJ, Schulte TW, Sausville E, Neckers LM, Toft DO. The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem* 1997, 272, 23843-23850.

**Gupta RS**. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* 1995, 12, 1063-73.

**Habeebu SS**, Liu J, Klaassen CD. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, 2, 203-209.

**Hamer DH**. Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 1986, 55, 913-951.

**Hart FU**. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996, 381, 571-580.

**Heikkila JJ**. Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. *J Biol Chem* 1982, 257, 12000-12005.



**Hickey E**, Brandon SE, Smale G, Lloyd D, Weber LA. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol Cell Biol* 1989, 9, 2615-2626.

**Hoffmann T**, Hovemann B. Heat-shock proteins, Hsp84 and Hsp86, of mice and men: two related genes encode formerly identified tumor-specific transplantation antigens. *Gene* 1988, 74, 491-501.

**Holley SJ**, Yamamoto KR. A role for Hsp90 in retinoid receptor signal transduction. *Mol Biol Cell* 1995, 6, 1833-1842.

**Imagawa M**, Ishikawa Y, Shimano H, Osada S, Nishihara T. CTG triplet repeat in mouse growth inhibitory factor/metallothionein III gene promoter represses the transcriptional activity of the heterologous promoters. *J Biol Chem* 1995, 270, 20898-20900.

**Itoh H**, Tashima Y. Domain structure of the 90-kDa stress protein: heparin- and antibody-binding domain. *Int J Biochem* 1993, 25, 157-161.

**Izgut-Uysal VN**, Derin N, Agac A. Effect of cold restraint stress on the distribution of trace elements in rat tissues. *Biol Trace Elem Res* 2000, 78, 149-155.

**Jakob U**, Buchner J. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* 1994, 19, 205-211.

**Jakob U**, Lilie H, Meyer I, Buchner J. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem* 1995, 270, 7288-7294.

**Jarup L**, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 1998, 24, 240.

**Jonshon JL**, Craig EA. Protein folding in vivo: unraveling complex pathways. *Cell* 1997, 90, 201-204.

**Jove R**, Garber EA, Iba H, Hanafusa H. Biochemical properties of p60v-src mutants that induce different cell transformation parameters. *J Virol* 1986, 60, 849-857.

**Kagi JH**, Himmelhoch SR, Whanger PD, Bethune JL, Vallee BL. Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content. *J Biol Chem* 1974, 249, 3537-3542.

**Kagi JH**, Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothioneins. In: Metallothionein II.; *Experimental Supplementum* 52, (Kagi J.H.R, Kojima Y. eds), Birkhauser-Verlag, Basel, 1987, 25-61.

**Kagi JH**. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* 1991, 205, 613-626.

**Kagi JH.** Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: In: Suzuki, K.T., Imura, N., Kimura, M. (Eds.), *Metallothionein III*. Basel: Birkhauser-Verlag, 1993, 29-55.

**Kelly EJ, Sandgren EP, Brinster RL, Palmiter RD.** A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94, 10045-10050.

**Kito H, Ose Y, Hayashi K, Yonezawa S, Sato T, Ishikawa T, Nagase H.** Some properties of metallothioneins from hepatopancreas and kidney in carp (*Cyprinus carpio*). *Eisei Kagaku* 1984, 30, 119-125.

**Kito H, Ose Y, Sato T.** Cadmium-binding protein (metallothionein) in carp. *Environ Health Perspect* 1986, 65, 117-124.

**Koyasu S, Nishida E, Kadowaki T, Matsuzaki F, Iida K, Harada F, Kasuga M, Sakai H, Yahara I.** Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83, 8054-8058.

**Krone PH, Sass JB.** HSP 90 alpha and HSP 90 beta genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 204, 746-752.

**Krone PH, Sass JB, Lele Z.** Heat shock protein gene expression during embryonic development of the zebrafish. *Cell Mol Life Sci* 1997, 53, 122-129.

**Leber AP, Miya TS.** A mechanism for cadmium- and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: involvement of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976, 37, 403-414.

**Liu J, DeFranco DB.** Chromatin recycling of glucocorticoid receptors: implications for multiple roles of heat shock protein 90. *Mol Endocrinol* 1999, 13, 1335-1336.

**Liu J, Klaassen CD.** Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996, 29, 294-300.

**Liu J, Liu Y, Michalska AE, Choo KH, Klaassen CD.** Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, 136, 260-268.

**Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD.** Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl<sub>2</sub>-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci* 1998, 46, 197-203.

**Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH.** Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, 1936-1940.

**Margoshes M, Vallee BL.** A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 1957, 79, 4813-4814.

**Masters BA**, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91, 584-588.

**McKim JM Jr**, Choudhuri S, Klaassen CD. In vitro degradation of apo-, zinc-, and cadmium-metallothionein by cathepsins B, C, and D. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, 116, 117-124.

**Meng X**, Baulieu E, Catelli M. Isolation of chicken HSP90 $\beta$  gene promoter. *Biochem Biophys Res Com* 1995, 2, 644-651.

**Meng X**, Jérôme V, Devin J, Baulieu E, Catelli M. cloning of chicken hsp90 $\beta$ : The only vertebrate hsp90 insensitive to heat shock. *Biochem Biophys. Res Com* 1993, 2, 630-636.

**Michalska AE**, Choo KH. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90, 8088-8092.

**Mimnaugh EG**, Chavany C, Neckers L. Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J Biol Chem* 1996, 271, 22796-22801.

**Minami Y**, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol Cell Biol* 1994, 14, 1459-1464.

**Misra S**, Zafarullah M, Price-Haughey J, Gedamu L. Analysis of stress-induced gene expression in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock. *Biochim Biophys Acta* 1989, 1007, 325-333.

**Miyata Y**, Yahara I. Interaction between casein kinase II and the 90-kDa stress protein, HSP90. *Biochemistry* 1995, 34, 8123-8129.

**Moore SK**, Kozak C, Robinson EA, Ullrich SJ, Appella E. Cloning and nucleotide sequence of the murine hsp84 cDNA and chromosome assignment of related sequences. *Gene* 1987, 1, 29-40

**Moore SK**, Kozak C, Robinson EA, Ullrich SJ, Appella E. Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origins. *J Biol Chem* 1989, 264, 5343-5351.

**Morimoto RI**, Kroeger PE, Cotto JJ. The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *EXS* 1996, 77, 139-163.

**Morimoto RI**, Tissiers A, Georgopoulos C. (Eds.) 1994. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Nielson KB**, Winge DR. Order of metal binding in metallothionein. *J Biol Chem* 1983, 258, 13063-13069.

**Nover L, Scharf KD.** 1991 Heat Shock Response. CRC Press, Fl, 41-127.

**Olsson PE, Haux C, Forlin L.** Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol Biochem* 1987, 3, 39-47.

**Ovelgonne JH, Souren JE, Wiegant FA, Van Wijk R.** Relationship between cadmium-induced expression of heat shock genes, inhibition of protein synthesis and cell death. *Toxicology* 1995, 99, 19-30.

**Ozawa K, Murakami Y, Eki T, Soeda E, Yokoyama K.** Mapping of the gene family for human heat-shock protein 90 alpha to chromosomes 1, 4, 11, and 14. *Genomics* 1992, 12, 214-220.

**Palmisano AN, Winton JR, Dickhoff WW.** Sequence features and phylogenetic analysis of the stress protein hsp90alpha in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), a poikilothermic vertebrate. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 258, 784-791.

**Palmiter RD.** Molecular biology of metallothionein gene expression *Experientia Suppl* 1987, 52, 63-80.

**Palmiter RD.** Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91, 1219-1223.

**Pan F, Zarate JM, Tremblay GC, Bradley TM.** Cloning and characterization of salmon hsp90 cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *J Exp Zool* 2000, 287, 199-212.

**Parsell DA, Lindquist S.** The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 1993, 27, 437-496.

**Petito CT, Beck B.** Evaluation of evidence of nonlinearities in the dose-responsive curve for arsenic carcinogenesis. *Trace Sub Environ Health* 1990, 24, 143-176.

**Pratt WB, Toft DO.** Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997, 18, 306-360.

**Pratt WB.** The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998, 217, 420-434.

**Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH.** Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 1997, 90, 65-75.

**Quaife CJ**, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 1994, 33, 7250-7259.

**Quraishi H**, Rush SJ, Brown IR. Expression of mRNA species encoding heat shock protein 90 (hsp90) in control and hyperthermic rabbit brain. *J Neurosci Res* 1996, 43, 335-345.

**Radanyi C**, Renoir JM, Sabbah M, Baulieu EE. Chick heat-shock protein of Mr = 90,000, free or released from progesterone receptor, is in a dimeric form. *J Biol Chem* 1989, 264, 2568-2573.

**Realini C**, Rogers SW, Rechsteiner M. KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett* 1994, 348, 109-113.

**Rebbe NF**, Hickman WS, Ley TJ, Stafford DW, Hickman S. Nucleotide sequence and regulation of a human 90-kDa heat shock protein gene. *J Biol Chem* 1989, 264, 15006-15011.

**Roesijadi G**. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 1992, 22, 81-113.

**Rose DW**, Wettenhall RE, Kudlicki W, Kramer G, Hardesty B. The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase has sequence similarity with the 90-kilodalton heat shock protein. *Biochemistry* 1987, 26, 6583-6587.

**Samson SL**, Gedamu L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998 59 257-288.

**Schlatter LK**, Howard KJ, Parker MG, Distelhorst CW. Comparison of the 90-kilodalton heat shock protein interaction with in vitro translated glucocorticoid and estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 1992, 6, 132-140.

**Schulte TW**, Blagosklonny MV, Ingui C, Neckers L. Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J Biol Chem* 1995, 270, 24585-24588.

**Schulte TW**, Blagosklonny MV, Romanova L, Mushinski JF, Monia BP, Johnston JF, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. Destabilization of Raf-1 by geldanamycin leads to disruption of the Raf-1-MEK-mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Mol Cell Biol* 1996, 16, 5839-5845.

**Schulte TW**, Toretsky JA, Ress E, Helman L, Neckers LM. Expression of PAX3 in Ewing's sarcoma family of tumors. *Biochem Mol Med* 1997, 60, 121-126.

**Shaknovich R**, Shue G, Kohtz DS. Conformational activation of a basic helix-loop-helix protein (MyoD1) by the C-terminal region of murine HSP90 (HSP84). *Mol Cell Biol* 1992, 12, 5059-5068.



**Shue G, Kohtz DS.** Structural and functional aspects of basic helix-loop-helix protein folding by heat-shock protein 90. *J Biol Chem* 1994, 269, 2707-2711.

**Stancato LF, Chow YH, Hutchison KA, Perdew GH, Jove R, Pratt WB.** Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem* 1993, 268, 21711-21716.

**Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP.** Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 1997, 89, 239-250.

**Sullivan WP, Vroman BT, Bauer VJ, Puri RK, Riehl RM, Pearson GR, Toft DO.** Isolation of steroid receptor binding protein from chicken oviduct and production of monoclonal antibodies. *Biochemistry* 1985, 24, 4214-4222.

**Suzuki TK.** Metallothionein: analysis in tissues and toxicological significance. Cadmium in the *Human Environment* 1992, 211-216.

**Szyszk R, Kramer G, Hardesty B.** The phosphorylation state of the reticulocyte 90-kDa heat shock protein affects its ability to increase phosphorylation of peptide initiation factor 2 alpha subunit by the heme-sensitive kinase. *Biochemistry* 1989, 28, 1435-1438.

**Tbarka N, Richard-Mereau C, Formstecher P, Dautrevaux M.** Biochemical and immunological evidence that an acidic domain of hsp 90 is involved in the stabilization of untransformed glucocorticoid receptor complexes. *FEBS Lett* 1993, 322, 125-128.

**Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M.** The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991, 7, 337-347.

**Uma S, Hartson SD, Chen JJ, Matts RL.** Hsp90 is obligatory for the heme-regulated eIF-2alpha kinase to acquire and maintain an activable conformation. *J Biol Chem* 1997, 272, 11648-11656.

**Uyeno T, Smith GR.** Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science* 1972, 175, 644-646.

**Voss AK, Thomas T, Gruss P.** Mice lacking hsp90 beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* 2000, 127, 1-11.

**Wartmann M, Davis RJ.** The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* 1994, 269, 6695-6701.

**Webb M.** Toxicological significance of metallothionein. In: Metallothionein II, Kagi and Kojima (ED.), *Birkhauser, Basel*, 1987, 109-134.

**West AK, Stallings R, Hildebrand CE, Chiu R, Karin M, Richards RI.** Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. *Genomics* 1990, 3, 513-518.

**Westin G, Schaffner W.** Heavy metal ions in transcription factors from HeLa cells: Sp1, but not octamer transcription factor requires zinc for DNA binding and for activator function. *Nucleic Acids Res* 1988, 13, 5771-5581.

**Whitelaw ML, McGuire J, Picard D, Gustafsson JA, Poellinger L.** Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92, 4437-4441.

**WHO/IPCS.** Cadmium, Environmental Health Criteria 134, Geneva, WHO, 1992, 87-89.

**Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, Jakob U.** Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 1992, 358, 169-170.

**Wu C.** Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11, 441-469.

**Young JC, Schneider C, Hartl FU.** In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett* 1997, 418, 139-143.

**Zafarullah M, Bonham K, Gedamu L.** structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol Cell Biol* 1988, 8, 4469-4476.

**Zeng J, Vallee BL, Kagi JH.** Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88, 9984-9988.

**Zhou T, Zhou G, Song W, Eguchi N, Lu W, Lundin E, Jin T, Nordberg G.** Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology* 1999, 142, 1-13.

**Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R.** Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 1998, 94, 471-480.

**Hart FU.** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996, 381, 571-580.

**Xu Y, Lindquist S.** Heat shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90, 7074-7078.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során olyan gének, géncsaládok azonosítását és expressziójának vizsgálatát tűztük ki célul, melyek jelentős szerepet játszanak az élőlények környezeti stresszel szembeni védekezésben. A dolgozatban két, a stressz-válaszáadásban bizonyítottan résztvevő géncsalád, a metallothioneinek és a *hsp90* vizsgálatát foglaltuk össze. Célunk volt mind a két családból lehetőleg több izoforma azonosítása. Ennek sikere esetén terveztük az izoformákat kódoló gének expressziójának vizsgálatát kezeletlen halak, illetve nehézfém expozíciónak és fizikai stressznek kitett állatok szerveiben.

### Általános megközelítés

A metallothionein és a HSP90 fehérjéket igen nagy fokú szekvencia-konzerváltság jellemzi. Első lépésben különböző fajok (ember, patkány, csirke, béka, hal) ismert MT és *hsp90* szekvenciáinak összehasonlításával evolúciósan konzervált régiókat azonosítottunk, és ezek felhasználásával PCR primereket terveztünk. A primerpozíciók kiválasztásánál mind a két család esetén ügyeltünk arra, hogy a primer párok által közrefogott szakaszon a különböző izoformák kellő különbséget mutassanak, így, ha azok jelen vannak pontyban is, megkülönböztethetők legyenek. Az ily módon szelektált és szintetizált oligonukleotidokat használtuk fel RT-PCR reakciókban a ponty MT és *hsp90* génekről szintetizálódott mRNS-ek egy-egy szegmensének amplifikálásához. Az amplifikált termékek ellenőrzését, izolálását és klónozását szekvenálás és a szekvenciák analízise követte. Mind a két családból két-két, egymáshoz nagymértékben hasonló, de egyértelműen megkülönböztethető gént sikerült azonosítanunk.

Úgy az MT, mint a *hsp90* gének kifejeződését a róluk szintetizálódott mRNS kimutatásával követtük, módszerként Northern hibridizációt és/vagy egy reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciót használva. Az azonosított szekvencia-különbségek lehetőséget biztosítottak az egyes génekre *specifikus* primerek tervezéséhez, illetve a klónozott cDNS szegmensek alkalmasak voltak arra, hogy hibridizációs próbaként használjuk őket. Vizsgáltuk a gének alapexpresszióját különböző szervezetekben, valamint az expressziójukban fémkezelések, illetve hő és hidegsokk hatására bekövetkező változásokat.

Halakban, úgy az MT, mint a *hsp90* génekre nézve viszonylag kevés az *in vivo* végzett kísérlet. Ugyancsak kevés fajban történt meg a két izoformát kódoló gén azonosítása illetve azok génspecifikus expressziójának vizsgálata. Kísérleteinket *in vivo*, kifejlett állatokkal végeztük, így az eredmények valószínűleg jól közelítik a valós ökoszisztémákban bekövetkező változások hatásait.

### **A metallothionein gének**

RT-PCR-al két MT cDNS-t amplifikáltunk pontyból. Izoláltuk továbbá a két cDNS-t kódoló strukturgéneket, és a kódoló régiótól 5' irányba eső szakaszokat is. A MT-1 cDNS szekvenciája azonos a tőlünk függetlenül, a jelen munka során közölt MT-I cDNS szekvenciával. A két gén intron-szekvenciái azonban komoly eltérést mutatnak, ami egyértelművé teszi, hogy nem azonosak egymással, annak ellenére, hogy azonos fehérjét kódolnak. Az általunk MT-2-nek nevezett gén újdonságnak számít, az általa kódolt fehérje aminosav összetétele jelentősen különbözik bármilyen, halakból eddig leírt MT izoformától.

A két gén alapexpressziója jellegzetes szövetspecifitást mutat: az MT-1 mRNS az agyban, májban, vesében és az izomban közel azonos mennyiségben van jelen, míg az MT-2 mRNS a szívben és az agyban mutatható ki nagyobb mennyiségben. A vizsgált szervek között nemcsak a két MT gén alapexpressziójában, hanem azok indukálhatóságában is jelentős különbséget találtunk, az alkalmazott stresszorok (fémkezelések, hirtelen hőmérsékletváltozás) szövet és gén-specifikus változásokat indukáltak. Egy adott fémre, adott koncentrációnál a legmagasabb indukciós szinteket mindig májban mértük, vesében azonos expozíciónál, fémtől függetlenül, mind az MT-1, mind az MT-2 indukciója csak 50-75%-a volt a májban mért értéknek.

A szövet-specifikus változások mellett fémkezelések hatására a két gén expressziójában fémtől és koncentrációtól függő, génspecifikus, tranziens indukciót detektáltunk. Az MT-2 gén mindegyik fémkezelés során, májban és vesében is jobban indukálódik, mint az MT-1. A három fém közül a Cd bizonyult a leghatékonyabb induktornak már 1 mg/l koncentrációban is jelentősen növelte mind a két MT gén expresszióját a májban és vesében. Az MT-1 gén már 1 mg/l koncentrációnál közel került az indukálhatósága felső határához, hiszen tízszer nagyobb fémkoncentráció is csak egy mérsékelt, 5-20 %-os további növekedést eredményezett mindkét szervben. Ugyanakkor azonos fémkoncentráció emelkedés hatására az MT-2 gén expressziója

továbbra is dinamikusan változott, és közel duplája volt az alacsonyabb koncentrációnál mért értéknek.

A Cu gyengébb MT-2 induktornak bizonyult, mint a Cd, még 10 mg/l koncentrációban is, pl. az indukció foka májban csak fele, vesében pedig harmada volt a hasonló koncentrációban alkalmazott Cd által elértnek. Ugyanakkor az MT-1 gént a Cd-hoz hasonló hatékonysággal indukálta, mindkét szövetben.

Az arzén hatása úgy az MT-2 mint az MT-1 gének expressziójára májban és vesében a leggyengébb volt a vizsgált fémek közül. Ugyanakkor, az agyban viszonylag mérsékeltén ugyan (1.8-2-szeres növekedés), de egyetlenként fokozta mindkét MT gén transzkripcióját.

A fizikai stresszorok közül a halak környezetének hirtelen hőmérsékletváltozást vizsgáltuk az MT gének expressziójára. A víz hőmérséklet emelése nem okozott mérhető változást egyik MT mRNS mennyiségében sem. A víz hőmérsékletének hirtelen csökkenése ezzel szemben jelentős változást eredményezett, ami szövet- és izoforma-specifikusan jelentkezett. Májban, az egy órás hidegsokkot követően a Cd kezeléssel összevethető növekedést mértünk mindkét mRNS mennyiségében, míg az öt órás inkubáció elteltével már nem volt jelentős változás a kezelt halak MT mRNS szintjéhez képest. A különböző agyterületekről vett mintákban nem, vagy jóval moderáltabb növekedést észleltünk az 1 órás kezelést követő *recovery* időszakban, viszont 5 óra elteltével a kontrollhoz képest drasztikus csökkenés jellemezte az MT mRNS mennyiségét. Ahogy a fémkezeléseknél, itt is különbség mutatkozott az MT-1 és MT-2 gének szabályozásában, azonban a hidegsokk inkább az MT-1 gén expresszióját befolyásolta.

### A *hsp90* gének

Két, leginkább a *Danio rerio* *hsp90α* és *hsp90β* génjeivel homológ *hsp90* gént azonosítottunk pontyban. Ebben a fajban mindkettő újdonság, és a zebradánió mellett a második példa arra, hogy halakban is létezik a két izoforma. Vizsgáltuk a két gén alapexpresszióját májban, vesében és agyban. A *hsp90β* nem induktív körülmények között viszonylag magas szinten expresszálódik minden vizsgált szövetben, az mRNS mennyisége összemérhető a β-aktin mRNS mennyiségével. A *hsp90α* ezzel szemben a vizsgált szervben közel százszor alacsonyabb alapexpresszióval rendelkezik, kivéve az agyat, ahol a többi szervhez képest közel tízszer magasabb szinten nyilvánul meg.



Megvizsgáltuk a két *hsp* gén indukciós tulajdonságait is hő- és hidegsokk, valamint Cd kezelés hatására. A *hsp90β* a vizsgált szervekben kevésbé reagált a hőkezelésre, szövettől függetlenül egy mérsékelt, 1.5-2-szeres indukciót figyeltünk meg. A *hsp90α* viszont szövetspecifikusan reagált a hősokra: agyban 10-14-szeres, míg vesében és májban csak 2-3-szoros indukciót detektáltunk. Az agyban mért magas alapszint és az erős indukálhatóság arra utalhat, hogy a *hsp90α* ebben a szervben specifikus funkciót láthat el. A hidegsokk szintén indukálta a *hsp90α* expressziót, de kisebb különbséggel az egyes szervek között: agyban 3-4 szeres, májban 4-4.5-szeres indukciót mértünk. A maximális indukciót már közvetlenül a hidegsokk után is mérni tudtuk, az ezt követő 1 óra *recovery* periódus nem növelte lényegesen az expressziós szintet.

A *hsp90α* expresszió vesében és májban meglepően érzéketlennek bizonyult a hősokkal szemben. Ezért megvizsgáltuk a gén indukálhatóságát Cd-al is, ami ismert, általános fehérjekárosodást okozó ágens. 10 mg/l koncentrációnál a vesében erős, legalább 20-25-szörös, tranziens *hsp90α* indukciót detektáltunk, míg a májban még ennél a koncentrációnál sem észleltünk expresszió növekedést. A tranziens indukció arra utal, hogy a gén fiziológiás körülmények között is indukálható a vesében, azt azonban nem gondoljuk, hogy ennek a Cd lenne a specifikus indukálószer. Valószínűleg létezik egy eddig még nem azonosított fiziológiás, vagy a környezetből eredő szignál, amelyre a *hsp90α* ilyen mértékű reakciója kifejlődött az evolúció során, és a Cd történetesen "modellezte" ezt a fiziológiás jelet. A májban csak 10 mg/kg intraperitoneális Cd kezelés hatására nőtt meg a *hsp90α* expresszió, a kísérlet végpontjában minimum 200-szoros expresszió növekedés volt mérhető.

## SUMMARY

As compared with studies of MTs and stress proteins in bacteria, yeast and mammals, studies on fish are still in the descriptive stages of documenting novel proteins produced in various tissues in response to a variety of stressors. A vast majority of the data were obtained from *in vitro* studies which concentrated on the protein expression pattern. In the present study, we summarize our results relating to the identification of two MT and *hsp90* genes isolated from the common carp (*Cyprinus carpio*) and studies of the expression patterns of these genes in a variety of tissues under different stress conditions. All experiments were carried out *in vivo*, on adult animals.

### The metallothionein genes

We isolated two MT cDNA species (MT-1 and MT-2) from *C. carpio*. The coding region of MT-1 was nearly identical to that of the known MT-I cDNA described from carp liver (AF002161), with only a single nucleotide, same sense difference. However, there are substantial differences within the intron sequences of the MT-1 and MT-I genes, unambiguously indicating the distinctness of the two genes coding for the same protein. The most likely explanation for this is an allelic variation, since *C. carpio* has a tetraploid genome. No cDNA sequence other than MT-I has been described for *C. carpio* previously, and the MT-2 cDNA reported in this study is therefore a novelty from this species.

On the basis of the significant sequence divergence of the 3' untranslated regions of the two cDNAs, isoform-specific primers were designed and used to measure the basal and induced MT-1 and MT-2 mRNA levels. There were comparable basal levels of the MT-1 transcript in the liver, kidney, brain and muscle. The amount of MT-2 mRNA from untreated animals, however, exhibited a significant variation among the

tissues examined, and was always less than that of the MT-1 transcript. The only exceptional organ was the heart, where we observed the opposite ratio, with the highest basal MT-2 and the lowest MT-1 mRNA levels. The relatively stable expression of MT-1 and the wide intertissue fluctuations in the MT-2 mRNA levels suggest that the two MT isoforms play distinct roles in carp tissues, the MT-2 gene product probably having a more tissue-specific function under physiological conditions. The uninduced MT mRNA levels were fairly constant from season to season, with the exception of the MT-2 transcript in the liver, which was higher and more variable in the summer.

The effects of exposure to metal ions on the expression of the MT-1 and MT-2 genes were followed by RT-PCR amplification. We found that, regardless of whether Cd, Cu or As was applied, or whether the liver or kidney was investigated, the treatment resulted in transient rises in the levels of the MT transcripts. The transient nature of the induction suggests that the phenomenon observed is part of the physiological regulation of the two MT genes, and not an experimental artifact generated by the high concentration of the metal ion. Besides this similarity, significant metal-, tissue- and isoform-dependent differences were found.

Of the three metals Cd was the most potent inducer: it substantially increased the expression of both MT genes in the liver and the kidney. MT-2 was induced in a concentration-dependent manner, while the expression of MT-1 was not greatly affected by a 10-fold increase of the Cd concentration, as if the MT-1 gene were already close to its maximal inducibility at around 1 mg/l Cd. We are aware that 10 mg/l Cd is a much higher concentration than any the animals are likely to encounter in nature. This high concentration was used merely to study the difference in regulation between the two MT genes. In our opinion, the high inducibility of MT-2 observed by means of Cd treatment evolved not to cope with this high Cd concentration, but to respond to some

other, still unidentified physiological or environmental inducer. It is probably a coincidence that Cd has a similar induction potential.

Copper proved to be a less potent MT-2 inducer than Cd: the level of induction achieved by 10 mg/l Cu treatment was 50% less in the liver, and 70% less in the kidney. In contrast, Cu and Cd induced the MT-1 gene to similar levels in both organs. The expression of the MT genes was least affected by As. This metal, however, was the only one that induced MT-1 and MT-2 in the brain, though the induction was moderate in both cases (1.8-2-fold).

Tissue-specific differences were also found. For a given metal at a given concentration, both the MT-1 and the MT-2 expression were more affected in the liver than in the kidney. In the kidney, the relative level of induction was always about 50-75% of that measured in the liver. The brain was unique among the organs investigated for neither Cd nor Cu induced either MT gene at any concentration; only cold shock and, to only a low extent, As influenced their expression in this tissue.

Hyperthermia had no measurable effect on the expression of either MT gene. Since the levels of *hsp70* and *hsp90* mRNAs in the same experiment were increased after a 1-h exposure to the elevated temperature, followed by the recovery period, we conclude that the insensitivity of the carp MT-1 and MT-2 genes to heat shock in the liver is not an experimental artifact, but reflects its physiological regulation.

Cold shock, however, induced both the MT-1 and the MT-2 genes in a tissue-specific manner. In the liver, after a 1-h cold treatment and a recovery period of 1-h, the induction was moderate for MT-2 (2.5-3-fold), whereas for MT-1 it was close to the maximal level achieved on Cd treatment. After cold exposure for 5-h, the levels of both MT mRNA returned to the basal level. In the brain, the MT-2 expression was almost unchanged after a 1-h cold exposure and a 1-h recovery, while the MT-1 mRNA level

was moderately increased (2-fold). However, there was a substantial reduction (30% of the control values) in both MT mRNA levels after 5-h cold treatment.

During the cold shock, we measured the Zn contents of the tissues investigated. We observed a good correlation between the MT mRNA levels and the Zn content. In the liver, there was an increase in Zn content (2-fold) after cold shock, while in the brain the Zn content had dropped dramatically (20% of the control value) after exposure for 1-h, and stayed at this level subsequently during the experiment. To our knowledge, this is the first revelation of a correlation between the MT expression levels and an alteration in Zn content after exposure of the animals to physical stress.

### **The *hsp90* genes**

We identified two cDNA species, belonging in the *hsp90* family, from *C. carpio*. Sequence comparisons at both nucleic and amino acid levels permit the partial cDNAs to be classified as *hsp90α* and *hsp90β*, additional evidence being provided in this way for the existence of two *hsp90* genes in teleosts.

To follow the tissue-specific expression of the two *hsp90* genes, differential Northern blot hybridization was developed. Additionally, on the basis of the sequence differences, isoform-specific primer pairs were designed for RT-PCR amplification. The expression patterns of the two *hsp90* genes supported the sequence-based classification. *hsp90β* is expressed at a relatively high level in all the organs examined (the brain, kidney and liver), while its mRNA level in untreated animals was comparable to the amount of  $\beta$ -actin mRNA (78-96%). The relative levels of uninduced *hsp90α* expression were much lower, and exhibited tissue specificity: 0.5-1% of the  $\beta$ -actin level in the liver and kidney, and about 8-10% in the brain.

Heat shock induced the *hsp90α* expression in a tissue-specific manner. The effect was most dramatic in the brain: 1-h of heat shock resulted in a 10-14-fold



induction in this organ, which was not significantly increased further even after 5 h of hyperthermia. This elevated *hsp90α* mRNA level also persisted during a 1-h recovery period. In the liver and kidney, RT-PCR amplification demonstrated a modest, 2-3-fold induction after 1-5 h of direct heat shock. The *hsp90β* gene was modestly (1.5-2.5-fold) inducible by heat shock in a tissue-independent manner.

The sudden decrease in the water temperature also induced the *hsp90α* mRNA level, both in the liver and in the brain. The difference in the responses of the two organs was not so dramatic as that during hyperthermia: a 3-4-fold induction was detected in the brain, and a 4-4.5-fold increase in the liver.

Cadmium at 10 mg/l induced the *hsp90α* mRNA level in the kidney, from the second hour of treatment. Its concentration continued to increase, reaching a maximum at 12 h. Densitometric analysis revealed a 20-25-fold increase between 2 and 12 h. The level of expression had decreased by 24 h, and at 96 h it was again undetected by Northern hybridization. In this experiment, we found no measurable effect of Cd on the *hsp90α* expression in the liver. Induction was observed only when the carp were injected intraperitoneally with 10 mg/kg Cd. The *hsp90α* mRNA could be detected from the sixth hour of treatment and there was a further 200-fold increase in the level of the transcript by 96 h. As concerns the expression of *hsp90β*, we did not find any significant effect of Cd in either tissue.

Cd treatment resulted in a high-level, transient induction in the kidney. The transient nature suggests that this induction is not an experimental artifact, but is governed by some physiological regulatory apparatus. We used Cd as an inducer of general protein damage, but the very high dose required makes it unlikely to be the physiological inductive signal, the nature of which remains unknown.